

Aus dem Institut für Zellbiologie (Tumorforschung)
der Universität Duisburg-Essen
Arbeitsgruppe DNA-Reparaturlabor

***Expression und Funktion von DNA-Reparaturmechanismen:
Determinanten für die Therapie-Resistenz
bei primären humanen Leukämiezellen***

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs Biologie und Geographie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

René Deenen
aus Tönisvorst

Essen, im Mai 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität-Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Jürgen Thomale

2. Gutachter: Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2006

Inhalt

1. Einleitung	4
1.1 Resistenzen in der Tumorthherapie	4
1.2 DNA-Reparatur und Sensitivität gegenüber DNA reaktiven Substanzen	6
1.3 DNA-Reparatur und Chronische Lymphatische Leukämie	13
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Häufig verwendete Chemikalien	16
2.1.2 Antikörper	16
2.1.3 DNA reaktive Substanzen	17
2.1.4 Puffer und Medien	17
2.1.5 Medienzusätze	17
2.1.6 Enzyme	17
2.1.7 (Oligo-) Nukleotide	18
2.1.8 Kits	18
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.10 Technische Geräte	19
2.1.11 Software	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Isolierung von humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut	20
2.2.2 Isolierung von humanen CD19 ⁺ Lymphozyten	20
2.2.3 <i>In vitro</i> -Exposition gegenüber DNA reaktiven Substanzen	21
2.2.4 Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)	21
2.2.5 Messung der Apoptose-Induktion nach Exposition gegenüber DNA reaktiven Substanzen (Annexin-V-Assay)	23
2.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen (γ H2AX-Assay)	24
2.2.7 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Hybridisierung auf Oligonukleotid-Microarrays (Affymetrix HG-U133A)	25
2.2.8 Bestimmung der Signalintensitäten (Affymetrix HG-U133A)	26
2.2.9 Fluoreszenzmarkierung von cDNA und Hybridisierung auf Oligonukleotid-Microarrays (MWG Custom Array "DNA-Reparatur-Chip")	28
2.3 Abkürzungen	29

3. Ergebnisse	31
3.1 Charakterisierung von CLL-Patienten	31
3.2 Funktionelle Untersuchung der DNA-Reparaturleistung von CD19 ⁺ CLL-Lymphozyten	31
3.2.1 Bestimmung der DNA-Strangbruchprozessierung von CD19 ⁺ CLL-Lymphozyten nach ENU-Exposition	31
3.2.2 Modulierung der DNA-Strangbruchprozessierung von CD19 ⁺ CLL-Lymphozyten	35
3.3 Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Tumorzellen	39
3.3.1 Auswahl einer Microarray-Plattform zur RNA-Expressionsanalyse	40
3.3.2 Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Lymphozyten im Hinblick auf die Chemosensitivität	43
3.3.2.1 Retrospektive RNA-Expressionsanalyse von mononukleären CLL-Zellen	43
3.3.2.2 RNA-Expressionsanalyse von gereinigten CD19 ⁺ CLL B-Lymphozyten	45
3.3.3 Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Lymphozyten im Hinblick auf die DNA-Reparaturkapazität	49
3.4 Funktionelle Untersuchung der DNA reaktiven Wirkung von Chlorambucil	56
3.4.1 Nachweis von DNA-Strangbrüchen nach Chlorambucil-Behandlung	57
3.4.2 Charakterisierung der durch Chlorambucil-Behandlung induzierten DNA-Strangbrüche	58
3.4.3 Relevanz der Chlorambucil induzierten DNA-Strangbrüche für die Induktion der Apoptose in normalen Lymphozyten	62
4. Diskussion	65
4.1 Das differenzierte DNA-Reparaturverhalten von Therapie resistenten CLL-Lymphozyten ist nicht auf eine einfache Veränderung im Genexpressionsprofil von distinkten DNA-Reparaturwegen zurückzuführen	66
4.2 Die DNA-Reparaturkapazität individueller CLL-Proben spiegelt sich in der differentiellen Genexpression distinkter Reparaturwege wider	69
4.3 Differentiell exprimierte „DNA damage response“-Gene interagieren in distinkten Signaltransduktionswegen	71

4.4	Phase I und II metabolisierende Enzyme werden in Therapie resistenten CLL-Lymphozyten weniger stark exprimiert	75
4.5	NER induzierte DNA-Einzelstrangbrüche verstärken die Apoptose nach <i>in vitro</i> -Behandlung von normalen Lymphozyten mit Chlorambucil	77
4.6	Ausblick	81
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literaturverzeichnis	85
7.	Anhang	96
7.1	Danksagung	96
7.2	Lebenslauf	97
7.3	Veröffentlichungen	98

1. Einleitung

1.1 Resistenzen in der Tumorthherapie

Die Entstehung von Resistenzen gegenüber einer zytostatischen bzw. zytoreduktiven Chemotherapie stellt das größte klinische Problem bei der Behandlung einer malignen Erkrankung dar. Therapie-Resistenz kann bereits vor Behandlungsbeginn in der Tumor-Stammzelle angelegt sein oder im Lauf der Tumorentwicklung sekundär als neu erworbene Eigenschaft auftreten. Letzteres wird durch die genetische Instabilität der Tumorzellen sowie die Mutagenität vieler Zytostatika zusätzlich begünstigt. Das Bild der klinischen Resistenz ist multifaktoriell bedingt und kann systemische, pharmakologische und zellkinetische Faktoren einschließen. Für das Therapie-Versagen ist jedoch häufig die zelluläre Resistenz verantwortlich.

Die veränderte Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber einer zytostatischen Behandlung kann auf eine Reihe von verschiedenen Mechanismen zurückgeführt werden. Grundsätzlich kommen z.B. veränderte Transportfunktionen für Zytostatika (verzögerter zellulärer Import, gesteigerter Export), Veränderung des zellulären Metabolismus (verringerte Aktivierung, beschleunigte Detoxifizierung von chemotherapeutisch wirksamen Agenzien) sowie, im Falle der häufig verwendeten DNA reaktiven Medikamente, veränderte zelluläre Reparaturfunktionen in Betracht. In den folgenden Abschnitten werden deshalb die verschiedenen zellulären Möglichkeiten zur Resistenzentwicklung vorgestellt.

Metabolisierende Enzyme

Ein Schritt in der Reihe möglicher Mechanismen, die zu einer Resistenzentwicklung führen können, wird durch so genannte „drug metabolizing enzymes“ (DMEs) katalysiert. Bei den durch DMEs vermittelten Biotransformationsreaktionen wird im menschlichen Organismus zwischen Phase I- und Phase II-Reaktionen unterschieden. Phase I-Reaktionen führen funktionelle Gruppen in unpolare Moleküle ein oder legen entsprechende funktionelle Gruppen frei. Phase II-Reaktionen sind

Konjugationsreaktionen, bei denen funktionelle Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt werden.

Die bekannteste Gruppe von Phase I metabolisierenden Enzymen ist die Superfamilie der Cytochrom P450 abhängigen Mono-Oxygenasen (CYP), die sich vermutlich als adaptive Antwort auf schädliche Umwelteinflüsse etabliert hat (Nebert und Gonzalez, 1987). Die Expression von Cytochrom P450 bzw. der wichtigsten Unterfamilien CYP1, CYP2 und CYP3 wurde in einer ganzen Reihe von humanen Krebserkrankungen nachgewiesen. So konnte beispielsweise CYP1B1-Expression in Tumoren der Lunge, der Leber und des Gastrointestinal-Traktes sowie bei Brust-, Prostata- und Blasenkrebs gezeigt werden (Murray *et al.*, 1997; Patterson und Murray, 2002). Anhand von CYP-Aktivitätsmessungen, Proteinbestimmungen und Nachweis von CYP spezifischer mRNA wurden für individuelle Tumorerkrankungen distinkte Cytochrom P450-Profile und eine selektive Aktivierung von Chemotherapeutika wie z.B. Cyclophosphamid, Ifosphamid, Dacarbazin und Procarbazin im Vergleich zu Normalgewebe gefunden (Patterson und Murray, 2002). Die tumorspezifische Wirkung dieser Substanzen hängt also in nicht unerheblichen Maß von der Anwesenheit dieser aktivierenden Enzyme ab. Eine Depletion der Cytochrom P450-Aktivität kann demnach zu einer zellulären Resistenz führen.

Der nächste Schritt im zellulären Metabolismus von Zytostatika wird von Phase II metabolisierenden Enzymen durchgeführt. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist die Glutathion-S-Transferase (GST), die zusammen mit SH-Gruppen tragenden Proteinen wie Metallothionein und Glutathion (GSH) eine große Rolle bei der Entgiftung von sowohl endogenen als auch exogenen toxischen, elektrophilen Substanzen spielt (Chao, 1996). Eine Überexpression von GST im Vergleich zu normalem Gewebe konnte u. a. für Darm- (Moorghen *et al.*, 1991; Mulder *et al.*, 1995), Lungen- (Koomagi *et al.*, 1996) und Magentumore (Okuyama *et al.*, 1994) gezeigt werden. Außerdem wurden alkylierende Substanzen wie z.B. Chlorambucil, Melphalan oder Cyclophosphamid-Metabolite als GST-Substrate identifiziert (Townsend und Tew, 2003).

Efflux-Systeme

Konjugate von GST und alkylierenden Medikamenten wie Chlorambucil sind wiederum Substrat für aktive Transmembran-Transportprozesse, die über ATP abhängige Efflux-Systeme zu einer Verminderung der zytotoxischen Wirkung führen. Bis heute sind etwa zehn ABC- („ATP binding cassette“) Transmembran-Transporter bekannt (Gottesman *et al.*, 2002; Kruh und Belinsky, 2003). Die erhöhte Aktivität dieser Transportproteine, die eine zelluläre Resistenz zur Folge haben kann, wird durch den so genannten „multidrug resistance“ (MDR) Phänotyp beschrieben, der ursprünglich mit der Überexpression des P-Glycoproteins (ABCB1; MDR1) assoziiert war (Nooter *et al.*, 1990). P-Glycoprotein ist dabei für den Transport der Antitumor-Wirkstoffe Doxorubicin, der Vinca-Alkaloide sowie der Taxane zuständig (Gottesman und Pastan, 1993).

1.2 DNA-Reparatur und Sensitivität gegenüber DNA reaktiven Substanzen

Die Integrität der DNA wird andauernd von endogenen Toxinen wie freien Radikalen aus dem zellulären Metabolismus und exogenen Substanzen wie z.B. Karzinogenen bedroht. Daher ist es nicht überraschend, dass sich im Lauf der Evolution eine Vielzahl von DNA-Reparaturmechanismen entwickelt hat (Christmann *et al.*, 2003; Sancar *et al.*, 2004), deren Ziel die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und die Weitergabe von unveränderter genetischer Information an die Tochterzellen ist.

Da die Wirksamkeit vieler der heute verwendeten Antitumor-Wirkstoffe auf der Interaktion mit genomischer DNA beruht, ist es ebenso wenig verwunderlich, dass DNA-Reparaturprozesse bei der Resistenzentwicklung in der Tumorthherapie eine große Rolle spielen (Drablos *et al.*, 2004; Madhusudan und Middleton, 2005). Im Folgenden sollen deshalb die wichtigsten eukaryotischen DNA-Reparatursysteme vorgestellt werden (Abb. 1; Abb. 2).

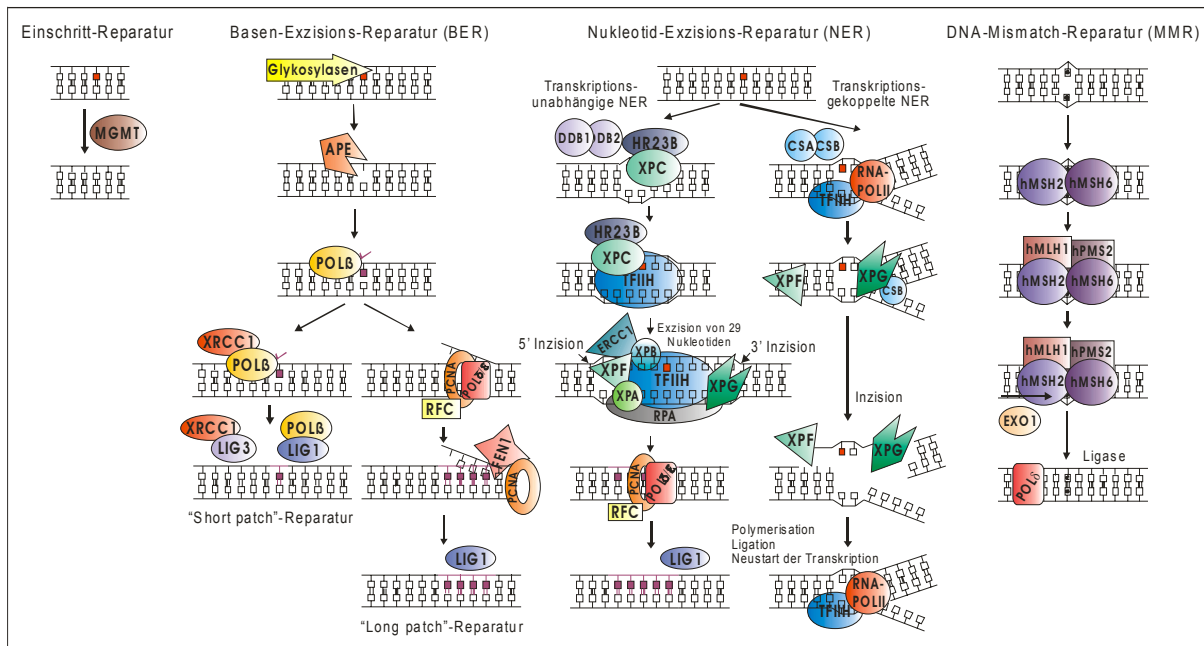


Abb. 1: Überblick über die Prozessierung von DNA-Schäden durch Einschritt-Reparatur, Basen-Exzisions-Reparatur, Nukleotid-Exzisions-Reparatur und Mismatch-Reparatur. Modifiziert von T. Bracker (IFZ) nach Christmann *et al.*, 2003 und Sancar *et al.*, 2004.

Einschritt-Reparatur durch MGMT

Bei der Einwirkung von alkylierenden Substanzen wie beispielsweise Ethyl- oder Methyl-Nitrosoharnstoff (ENU / MNU) auf die DNA entstehen u. a. verschiedene N-alkylierte und O-alkylierte Purine und Pyrimidine. Dabei ist O⁶-Alkylguanin, obwohl nur zu 8 % gebildet (Beranek, 1990), eine für die Integrität der DNA sehr bedeutende Modifikation. Durch die veränderten Basenpaarungs-Eigenschaften von O⁶-Methylguanin bzw. O⁶-Ethylguanin kommt es während der Replikation zu einem Fehleinbau von Thymin anstelle von Cytosin im neu synthetisierten Strang der DNA. Nach einer weiteren Replikationsrunde manifestiert sich somit eine GC→AT Transitionsmutation. Diese mutagenen DNA-Basenmodifikationen können in einem Einschritt-Reparaturmechanismus durch die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyl-Transferase (MGMT) beseitigt werden. Dabei wird die Alkylgruppe von der modifizierten DNA-Base auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms übertragen (Sedgwick *et al.*, 1988; Pegg *et al.*, 1995). Diese Reaktion führt zu einer irreversiblen Inaktivierung und zur proteasomalen Degradation der MGMT.

Während MGMT defiziente Zellen O⁶-Methylguanin nicht reparieren können und eine hohe Sensitivität gegen alkylierende Substanzen zeigen (Day, III *et al.*, 1980; Yarosh *et al.*, 1983), bewirkt die Überexpression des Reparaturproteins eine Resistenz

gegenüber O⁶-Guanin alkylierenden Substanzen. Ähnliches beobachtet man bei MGMT-„knockout“ Mäusen, die ebenfalls eine erhöhte Sensitivität sowie eine gesteigerte Mutationsrate nach Behandlung mit alkylierenden Substanzen aufweisen (Tsuzuki *et al.*, 1996; Shiraishi *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse, die MGMT überexprimieren, eine niedrigere Mutationsfrequenz in der Leber (Zhou *et al.*, 2001).

Endogene Methylierung des Genpromotors bzw. des *mgmt*-Gens selbst wirkt sich hingegen regulatorisch auf die *mgmt*-Expression aus. Während eine Methylierung des Promotors zu einer Inhibition der Genexpression und damit zu einer Sensitivierung gegenüber alkylierenden Substanzen führt (Qian *et al.*, 1995), konnte für die Methylierung der codierenden *mgmt*-Gensequenz selbst eine Expressions-Aktivierung und damit verbunden eine Resistenz gegen chloroethylierende Agentien gezeigt werden (Christmann *et al.*, 2001).

Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Die Basen-Exzisions-Reparatur ist für die Beseitigung von modifizierten Basen aus der DNA verantwortlich. Basenmodifikationen entstehen u. a. durch Oxidationsprozesse, wobei 8-Oxo-Guanin die häufigste und aufgrund ihrer Basenfehlpaarungs-Eigenschaften mit Adenin am meisten mutagene oxidative Basenmodifikation darstellt. Des Weiteren werden durch exogene Karzinogene wie Nitrosamine oder durch Antitumor-Wirkstoffe wie DTIC oder Temozolomid N-alkylierte Purine (7-Methylguanin, 3-Methyladenin, 3-Methylguanin) effektiv durch das BER-System entfernt. Die Basen-Exzisions-Reparatur setzt auch an abasischen Stellen an, die durch spontane Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung an N-alkylierten Purinen entstanden sind (Lindahl, 1990).

Die Basen-Exzisions-Reparatur wird durch DNA-Glykosylasen eingeleitet. In Säugerzellen sind bis heute elf verschiedene Glykosylasen bekannt, die z. T. sehr spezifisch Basenmodifikationen erkennen und die betroffene Base durch hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung entfernen (Schärer und Jiricny, 2001). Die so entstandene abasische Stelle (bzw. Apurin- (AP) Stelle) dient der AP-Endonuklease als Ansatzpunkt, um die verbleibende Phosphodiester-Bindung der DNA einzuschneiden. Die Reparaturlücke kann direkt durch Insertion eines einzelnen

Nukleotids durch DNA-Polymerase β und abschließende Ligation durch den DNA-Ligase-III-XRCC1-Komplex verschlossen werden („short patch“ BER) (Dianov *et al.*, 1992; Wilson, 1998). Abhängig von den molekularen Eigenschaften der Reparaturlücke kann alternativ ein Enzymkomplex um die DNA-Polymerasen δ bzw. ϵ die entfernte Base sowie eine darauf in 5'-Richtung der DNA folgende Sequenz von bis zu 10 Nukleotiden ersetzen („long patch“ BER). Die abschließende Ligation erfolgt durch DNA-Ligase I (Lindahl *et al.*, 1997; Klungland und Lindahl, 1997).

Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Große und „unförmige“ („bulky“) DNA-Modifikationen wie beispielsweise UV induzierte (6-4)-Photoprodukte oder Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere, aber auch DNA-Intrastrang-Verknüpfungen sowie größere chemische DNA-Läsionen, verursacht beispielsweise durch Aflatoxin oder Benzopyren, sind Substrate der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (Friedberg, 2001; Hanawalt, 2001; Mullenders und Berneburg, 2001).

Das NER-System besteht aus zwei Untersystemen, der Transkriptions-unabhängigen globalen Genom-Reparatur (GGR) und der Transkriptions-gekoppelten Reparatur (TCR) (de Laat *et al.*, 1999; Hanawalt, 2002). Die GGR entfernt DNA-Modifikationen aus nicht transkribierten Regionen des Genoms sowie aus den nicht codierenden Strängen von aktiv transkribierten DNA-Abschnitten. Die DNA wird nach der Schadenserkenkung durch das XPC-RAD23-Heterodimer in einem Bereich von etwa 20 Basenpaaren um die Modifikation herum durch die Helikase-Funktion der Untereinheiten XPB und XPD des Transkriptionsfaktors TFIIH aufgewunden. Die modifizierte Nukleotidsequenz wird anschließend mit zwei Inzisionen an definierten Positionen durch die Endonukleasen XPG und XPF-ERCC1 entfernt. Die entstandene Lücke wird durch die DNA-Polymerasen δ bzw. ϵ aufgefüllt und durch DNA-Ligase I verschlossen.

Die TCR hingegen beseitigt DNA-Modifikationen ausschließlich aus dem transkribierten Strang von aktiven Genen. Die Blockierung der RNA-Polymerase II an größeren DNA-Läsionen führt zur Rekrutierung von CSA- und CSB-Proteinen, die ihrerseits die Endonukleasen XPG und XPF-ERCC1 aktivieren. Die Resynthese und

Ligation erfolgt wie bei der GGR durch Polymerase δ/ϵ und Ligase I (Bohr *et al.*, 1985; Mellon *et al.*, 1987).

Ein hereditärer funktioneller Ausfall einzelner NER-Proteine äußert sich in einer Reihe von humanen UV-Sensitivitäts-Syndromen. So haben beispielsweise Xeroderma pigmentosum (XP)-Patienten aufgrund einer XPA- oder XPG-Defizienz u. a. ein deutlich (bis zu 1000fach) erhöhtes Hautkrebsrisiko durch die mutagene Wirkung von nicht reparierten DNA-Photoprodukten nach Sonnenbestrahlung (Cleaver, 2005). Auf der anderen Seite führen bestimmte mutationsbedingte Defekte in den Proteinen CSA oder CSB zu Cockayne's Syndrom (CS), das durch einen vollständigen Ausfall der TCR gekennzeichnet ist (van Hoffen *et al.*, 1993; Andressoo und Hoeijmakers, 2005; Cleaver, 2005). CS-Patienten weisen schwere Entwicklungs- und Wachstumsstörungen sowie neurologische Ausfälle auf (Nance und Berry, 1992). Dies wird mit einer gesteigerten Apoptoserate durch nicht reparierte endogene DNA-Schäden in aktiven Genen in Verbindung gebracht.

Mismatch-Reparatur (MMR)

Das Mismatch-Reparatursystem beseitigt Basenfehlpaarungen aus der DNA. Solche Fehlpaarungen entstehen beispielsweise durch Polymerasefehler bei der DNA-Replikation oder aber durch spontane oder induzierte Basen-Deaminierung, -Oxidierung oder -Methylierung (Modrich und Lahue, 1996; Umar und Kunkel, 1996). So zählen z.B. chemisch induzierte 8-oxo-Guanin/Adenin- (Colussi *et al.*, 2002; s. BER) und O^6 -Methylguanin/Thymin-Fehlpaarungen (Duckett *et al.*, 1996; s. Einschnitt-Reparatur) ebenso zu den Substraten des MMR wie UV induzierte Photoprodukte (Wang *et al.*, 1999) oder G-G-Intrastrang-Verknüpfungen nach Cisplatin-Therapie (Mello *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997).

Nach der spezifischen Erkennung der Basenfehlpaarung durch den heterodimeren MutS α -Komplex aus MSH2 und MSH6 (bzw. den MutS β -Komplex aus MSH3 und MSH6) und Rekrutierung der Mismatch-Reparaturproteine MLH1 und PMS2 wird die fehlgepaarte Base durch Exonuklease I ausgeschnitten und die entstandene Lücke durch DNA-Polymerase δ aufgefüllt (Christmann *et al.*, 2003).

Der funktionelle Ausfall von Komponenten der Mismatch-Reparatur führt zu erhöhten Mutationsraten und genetischer Instabilität, die beispielsweise für bestimmte familiäre

Darmkrebs-Formen („hereditary non-polyposis colon-cancer“, HNPCC) mitverantwortlich gemacht werden (Aaltonen *et al.*, 1993; Lynch *et al.*, 1993).

Doppelstrangbruch-Reparatur

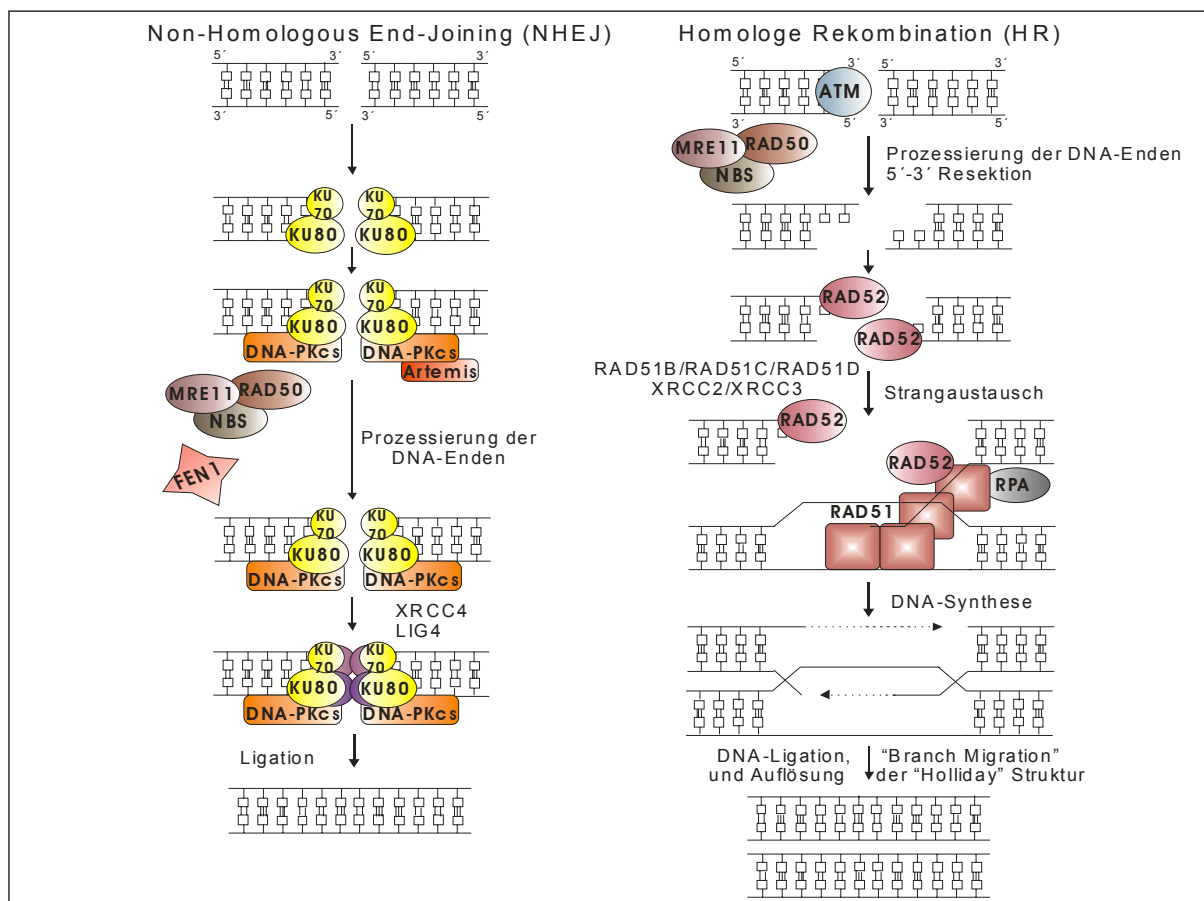


Abb. 2: Überblick über die Prozessierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Non-Homologous End-Joining und Homologe Rekombination. Modifiziert von T. Bracker (IFZ) nach Christmann *et al.*, 2003 und Sancar *et al.*, 2004.

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) besitzen sowohl ein hohes genotoxisches als auch zytotoxisches Potential (Dikomey *et al.*, 1998; Lips und Kaina, 2001; Pfeiffer *et al.*, 2004). Sie werden u. a. durch freie Sauerstoff-Radikale, ionisierende Strahlung und Replikation über Einzelstrangbrüche hinweg induziert. Außerdem entstehen regelmäßig endogene Doppelstrangbrüche bei der V(D)J-Rekombination und dem Immunglobulin-Klassenwechsel während der Antikörper-Reifung (Lieber *et al.*, 2004). DNA-Doppelstrangbrüche werden abhängig von der Zellzyklus-Phase durch zwei verschiedene Reparaturwege prozessiert: „Non-Homologous End-Joining“ (NHEJ) ist

der dominierende Weg in Säugerzellen (Haber, 2000; Cromie *et al.*, 2001) und hauptsächlich in der G₀/G₁-Phase des Zyklus aktiv, während die Homologe Rekombination (HR) in der späten S- und der G₂-Phase vorherrscht (Takata *et al.*, 1998; Johnson und Jasin, 2000).

Während des NHEJ-Prozesses werden zwei benachbarte Enden eines Doppelstrangbruches miteinander verbunden (Lieber *et al.*, 2004). Da hierzu keine Sequenzhomologie notwendig ist, ist das NHEJ-System relativ fehleranfällig. Im ersten Schritt der End-Joining-Reparatur bindet ein Heterodimer aus Ku70 und Ku80 an die freien DNA-Enden. Nach der Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) und Prozessierung der DSB-Enden werden die beiden DNA-Stränge durch das XRCC4-Ligase-IV-Heterodimer miteinander ligiert. Defekte im NHEJ-System führen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung sowie zu einer schweren Immundefizienz (SCID-Phänotyp) durch eine gestörte Lymphozytenentwicklung (Schwarz *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zum NHEJ-Doppelstrangbruch-Reparaturweg wird bei der Homologen Rekombination (Wyman *et al.*, 2004) eine DNA-Sequenz z.B. auf dem Schwesterchromatid als Matrize verwendet, so dass die HR fehlerfrei arbeiten kann. Der Doppelstrangbruch wird von der Proteinkinase ATM erkannt, die als übergeordneter Signalgeber in der Folge eine Reihe von DNA-Reparaturfaktoren phosphoryliert und aktiviert. RAD52 bindet an die DSB-Enden und fördert den Austausch mit dem homologen, unbeschädigten DNA-Strang, stimuliert durch RAD51 und RPA. Anschließend folgen DNA-Neusynthese, Ligation, die so genannte „branch migration“ und die Auflösung der entstandenen „Holliday Struktur“ (Constantinou *et al.*, 2001). Ausfall von ATM führt zu der autosomal rezessiv vererbaren Krankheit Ataxia Telangiectasia (AT), die durch erhöhte Strahlungssensitivität, Immundefizienz und ein gesteigertes Leukämie- bzw. Krebsrisiko charakterisiert ist (Lavin *et al.*, 2005).

1.3 DNA-Reparatur und Chronische Lymphatische Leukämie

In vielen Untersuchungen, die Fragestellungen rund um das hochkomplexe DNA-Reparatur-Netzwerk und das Thema Resistenzentwicklung betreffen, werden tumorabgeleitete, häufig genetisch instabile murine oder humane Zelllinien an Stelle von primären Tumorzellen verwendet. Abgeleitete resistente Sub-Klone sind oft biochemisch unzureichend charakterisiert und führen teilweise zu widersprechenden Ergebnissen, deren Relevanz für die klinische Situation in der Regel schwer zu beurteilen ist. In dieser Arbeit werden deshalb primäre humane Tumorzellen von Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL) als Modell verwendet, das im Folgenden vorgestellt wird.

Die CLL der B-Zellreihe (B-CLL) ist mit einer Inzidenz von 3/100000 Einwohnern die häufigste Leukämie der Erwachsenen in der westlichen Welt. Das mediane Alter der Erkrankten liegt bei etwa 70 Jahren; ungefähr 20 % der Patienten sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre.

Im Lauf der Erkrankung kommt es zu einer Akkumulation von reifen, aber immunologisch inkompetenten, monoklonalen B-Lymphozyten im peripheren Blut der Patienten. Diese Überschwemmung der Peripherie mit leukämischen B-Zellen ist nicht primär Folge einer gesteigerten Proliferationsaktivität des malignen Klons, sondern beruht vielmehr auf einer verlängerten Lebensdauer durch zelluläre Apoptosedefekte: Der programmierte Tod der betroffenen B-Zellen wird durch Überexpression des anti-apoptotischen *bcl-2*-Gens hinausgezögert, die ihrerseits durch eine Hypomethylierung im ersten Exon der Gensequenz bewirkt wird (Hanada *et al.*, 1993; Caligaris-Cappio, 2000).

Der klinische Verlauf der CLL ist sehr heterogen: Während die Erkrankung in frühen Stadien lange Zeit unauffällig sein kann und keine Behandlung erfordert, führt die CLL in fortgeschrittenen Stadien, oft trotz intensiver konventioneller Therapiemaßnahmen, rasch zum Tod. Die mittlere Überlebenszeit hängt damit stark vom Stadium der CLL zum Diagnosezeitpunkt ab und beträgt zwischen drei und zehn Jahren. Die Standardtherapie für behandlungspflichtig gewordene CLL-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung besteht in der sequenziellen Gabe des Stickstoff-Lost-Derivates Chlorambucil (CLB) (Wilhelm *et al.*, 1997). Chlorambucil ist eine bifunktionelle, alkylierende Substanz mit ausgeprägter antineoplastischer Wirkung,

relativ hohen Remissionsraten bei gleichzeitig guter Verträglichkeit und einfacher, oraler Darreichungsform. Ein anfänglich durchweg gutes Ansprechen auf die CLB-Behandlung mit einer Reduktion der peripheren Lymphozytenzahlen auf Normalwerte ist ein weiteres Kennzeichen der CLL. Nach einem oder mehreren Behandlungszyklen jedoch verliert die Chlorambucil-Therapie in der Regel ihre Wirkung und alle CLL-Patienten entwickeln in der Folge eine klinische Resistenz gegenüber CLB. Alternative Therapiestrategien sehen in diesem Fall meist den Einsatz des Nukleotid-Analogen Fludarabin (FA) vor. Auch gegen FA entwickeln sich nach anfänglich gutem Ansprechen Resistenzen, was in der Folge zu Patienten mit multiresistentem Phänotyp und aggressivem Krankheitsverlauf der CLL führt. Durch *in vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die klinische Resistenz gleichbedeutend mit zellulärer Resistenz ist (Silber *et al.*, 1994; Bramson *et al.*, 1995).

Die beschriebenen Charakteristika der CLL, nämlich

- die Verfügbarkeit einfach aufzureinigender, homogener Tumorzell-Populationen aus peripherem Blut,
- die Arretierung der Tumorzellen in der G₀-Phase des Zellzyklus,
- die Resistenzentwicklung gegen DNA reaktive Substanzen,
- die Korrelation der klinischen Resistenz gegen CLB mit der zellulären Resistenz *in vitro*

machen diese Tumorerkrankung zu einem sehr gut geeigneten Modellsystem zur Untersuchung von DNA-Reparaturmechanismen bei der Resistenzentwicklung in der Tumorthherapie.

In vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnten funktionelle Unterschiede in den DNA-Reparaturprofilen von normalen und CLL-Lymphozyten bestimmt werden (Thomale *et al.*, 1994; Buschfort *et al.*, 1997). Außerdem wurde ebenso eine erhöhte Reparaturkapazität in Therapie resistenten CLL-Lymphozyten festgestellt (Müller *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1997). Die molekularen Determinanten für diese Variationen sind jedoch aufgrund der komplexen Struktur des DNA-Reparatur-Netzwerkes mit mehr als hundert beteiligten Genen bisher weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher mit Hilfe der Microarray-Technologie das „DNA-Reparatur-Transkriptom“ von hoch aufgereinigten CD19⁺ Tumorzellen von unbehandelten und CLB sensitiven CLL-Patienten im Vergleich zu den entsprechenden Zellen Therapie resistenter Patienten untersucht werden. Des Weiteren sollte versucht werden, die Expressionsmuster der DNA-Reparaturgene mit funktionellen Eigenschaften der CD19⁺ CLL-Tumorzellen zu korrelieren und mögliche systematische Unterschiede zur Regulation dieser Gene bei normalen Lymphozyten zu ermitteln. Schließlich sollte auch untersucht werden, über welche speziellen Reparaturwege CLB induzierte DNA-Läsionen in diesen Zellen prozessiert werden und ob die unterschiedlichen Zytostatika dabei synergistische Wirkungen entfalten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Häufig verwendete Chemikalien

Agarose	Biozym
DAPI	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Low-Melting-Point (LMP) Agarose	Biozym
n-Laurylsarcosinat	Serva
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Paraformaldehyd	Sigma
Salzsäure (HCl)	Merck
SYBR-Green	Roche
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Merck

Weitere Chemikalien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad von den Firmen Merck und Sigma bezogen.

2.1.2 Antikörper

anti-CD19 "Micro-Beads" (human)	Miltenyi Biotech
mouse-anti-phospho-Histone H2AX	Upstate
goat-anti-mouse Alexa Fluor488	Molecular Probes

2.1.3 DNA reaktive Substanzen

Chlorambucil	Sigma
EthylNitrosoharnstoff	Sigma
Fludarabin	Sigma
Methoxyamin	Sigma
NU7026	Sigma

2.1.4 Puffer und Medien

HAES-steril	Fresenius Kabi
Lymphozyten-Trennnmedium LSM1077 (Ficoll)	PAA
PBS	Medienküche des IFZ
RPMI1640	Medienküche des IFZ

2.1.5 Medienzusätze

Rinderserum-Albumin (BSA)	PAA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
Glutamin	Medienküche des IFZ
HEPES	Serva
Natrium-Pyruvat	Medienküche des IFZ
Penicillin/Streptomycin	Medienküche des IFZ

2.1.6 Enzyme

<i>E. coli</i> DNA Ligase	TaKaRa
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	Life Technologies
RNase H	TaKaRa
Superscript II	Life Technologies
T4 DNA Polymerase I	TaKaRa

2.1.7 (Oligo-) Nukleotide

Cy5-dUTP	Amersham
dNTPs	Invitrogen/Roche
Biotin-11-dCTP	Perkin Elmer
Biotin-11-dUTP	Perkin Elmer
Kontroll-Oligonukleotid-Mix	MWG Biotech
T7-oligo(dT) ₂₄ -Primer	MWG Biotech

2.1.8 Kits

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	BD
BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Diagnostics
High Pure RNA Tissue Kit	Roche
MEGAscript T7 Kit	Ambion
PhaseLock Gel Separation	Eppendorf
RiboGreen RNA Quantitation Reagent and Kit	Molecular Probes
RNeasy Mini (Midi) Kit	Qiagen

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

MACS LS ⁺ Säulen	Miltenyi Biotech
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotech
Custom Array "DNA-Reparatur-Chip"	MWG Biotech
GelBond Folie	Cambrex (Biozym)
HG-U133A Microarrays	Affymetrix
ImmunoSelect Adhäsionsobjektträger	Squarix
Zellkultur-Kammern („culture slides“)	BD Falcon

2.1.10 Technische Geräte

Coulter Epics XL

Fluoreszenzmikroskop Axioplan

Fluoreszenzreader FL500

GeneArray Scanner 2500

Inkubator C200

Netzgerät

Speed Vac-Konzentrator

Thermomixer

Tischzentrifuge 5415D

Zentrifuge Rotina 48

Beckman Coulter

Zeiss

BioTec Instruments

Agilent

Labotect

Renner

Savant

Eppendorf

Eppendorf

Hettich

2.1.11 Software

ACAS ICM

Coulter Epics XL-MCL System II, Version 3.0

Decision Site for Functional Genomics 8.1

MAVI

Microarray Suite (MAS) 5.0

Origin 7.0

Pathway Architect

RMAexpress

Ahrens Electronics

Beckman Coulter

Spotfire

MWG Biotech

Affymetrix

Origin Lab Corporation

Stratagene

B.M. Bolstad, Stanford

University, Berkeley

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut

RPMI1640, (supplementiert)

<i>FCS</i>	10 % (v/v)
<i>HEPES</i>	5 mM
<i>Penicillin / Streptomycin</i>	1 %
<i>Glutamin</i>	2 mM

in RPMI1640

FrISChe, heparinisierte Blutproben von CLL-Patienten oder normalen Spendern wurden 1:2 mit PBS verdünnt, einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen und die separierten mononukleären Zellen aus der entstandenen Interphase entnommen. Nach zwei Wasch-Schritten mit PBS wurden die Zellen in RPMI1640-Medium aufgenommen. CLL-Tumorzellen wurden nur von Patienten isoliert, die bisher entweder noch nicht behandelt worden waren oder sich unmittelbar vor einer Chemotherapie befanden bzw. mindestens drei Wochen seit dem letzten Behandlungszyklus vergangen waren.

2.2.2 Isolierung von humanen CD19⁺ Lymphozyten

MACS-Puffer

<i>BSA</i>	0,5 % (v/v)
<i>EDTA</i>	2 mM

in PBS, pH 7,2; entgast

Maximal 2×10^8 Ficoll gereinigte mononukleäre Zellen wurden in MACS-Puffer überführt und für 15 min bei 4 °C mit einem magnetischen („Micro-Bead“ gekoppelten) anti-CD19 Antikörper (20 µl / 1×10^7 mononukleäre Zellen) inkubiert. Die Zellsuspension wurde über eine Positiv-Selektionssäule im Magnetfeld gegeben, so

dass sich unerwünschte Zellpopulationen im Durchlauf befanden und die zurückgehaltenen CD19⁺ Lymphozyten nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld ausgewaschen werden konnten. Die so isolierten Zellen wurden aus dem MACS-Puffer in RPMI1640-Medium überführt.

2.2.3 *In vitro*-Exposition gegenüber DNA reaktiven Substanzen

Frisch isolierte humane Zellen wurden zur Bestimmung von DNA-Reparaturkinetiken mit Ethylnitrosoharnstoff (150 µg/ml) für 30 min oder mit Chlorambucil (50 µM) für 24-30 h inkubiert.

Zur Apoptose-Induktion wurden die Zellen mit Chlorambucil (5-50 µM) für 24 h behandelt.

Zur Untersuchung der Beteiligung unterschiedlicher DNA-Reparaturwege bzw. der Modulation der apoptotischen Antwort wurden die Zellen jeweils 1 h vor der ENU- bzw. Chlorambucil-Behandlung mit Fludarabin (1 µg/ml), Methoxyamin (1 mM; 5 mM) bzw. NU7026 (5-20 µM) vorinkubiert.

Die Inkubation erfolgte grundsätzlich in RPMI1640-Medium für den angegebenen Zeitraum in H₂O gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots zur weiteren Analyse entnommen.

2.2.4 Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)

50x TAE-Puffer

Tris	242 g
Eisessig	57 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
Adest	ad 1000 ml

LMP-Agarose

LMP-Agarose	0,75 % (w/v)
-------------	--------------

in PBS; zweimal aufkochen, aliquotieren und bei 4 °C lagern.

Lyse-Puffer

NaCl	2,5 M
EDTA	100 mM
Tris	10 mM
n-Laurylsarcosinat	1 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)
Triton X-100	1 % (v/v)

DMSO und Triton X-100 erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben

Elektrophorese-Lösung

NaOH	300 mM
EDTA	1 mM
Tris	10 mM

*mit HCl auf pH 12,7 (RT) einstellen
jeweils frisch ansetzen*

Neutralisierungs-Lösung

Tris	400 mM
------	--------

mit HCl auf pH 7,4 (RT) einstellen

Zur Quantifizierung von Reparatur induzierten DNA-Strangbrüchen nach Exposition gegenüber DNA reaktiven Substanzen wurde der alkalische Comet Assay verwendet (Singh *et al.*, 1988; McNamee *et al.*, 2000; Bracker *et al.*, 2006).

Dazu wurden 8-well Zellkultur-Kammern (BD „culture slides“) vorsichtig von ihren Objektträgern gelöst und auf GelBond Folie geklebt. Je 2×10^4 Zellen wurden in 45 µl LMP-Agarose (42 °C) aufgenommen und in das entsprechende well der Zellkultur-Kammer pipettiert. Bei Kurzzeit-Analysen bis zu 2 h (ENU) wurden die Zellkultur-Kammern zum Ende der Kinetik entfernt und die Gele auf der Folie über Nacht bei 4 °C im Dunkeln in Lyse-Puffer inkubiert. Bei länger dauernden Kinetiken (Chlorambucil) wurden die einzelnen wells der Zellkultur-Kammern mit 50 µl LMP-Agarose (80 °C) vorbeschichtet, 2×10^4 Zellen in 30 µl LMP-Agarose (42 °C) in das

entsprechende well pipettiert und nach dem Aushärten der Agarose mit jeweils 200 µl Lyse-Puffer im well bei RT bis zum Ende der Kinetik inkubiert. Anschließend wurde die Zellkultur-Kammer wiederum entfernt und die gesamte Folie über Nacht in Lyse-Puffer bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Denaturierung in Elektrophorese-Lösung (ENU: 15 min, RT; Chlorambucil: 45 min, RT) wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (20 min; 4 °C; pH 12,7; 1,5 V/cm; 300 mA), 30 min bei RT in Neutralisierungs-Lösung inkubiert und abschließend 30 min in Ethanol abs. entwässert. Die Gele wurden über Nacht getrocknet und bis zur Auswertung im Dunkeln gelagert. Unmittelbar vor der Auswertung erfolgte die Färbung der DNA mit SYBR-Green (1:10000 in 1x TAE-Puffer).

Die Auswertung des Comet Assays erfolgte an einem Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop mit dem Mehrparameter-Bildanalyse-System ACAS ICM. Pro Messpunkt wurden jeweils mindestens 100 Zellen erfasst und das „Olive Tail Moment“ (OTM; Produkt aus dem DNA-Gehalt im Kometenschweif und dem Abstand zwischen Kometenkopf und der Hauptfluoreszenz im Kometenschweif) als Maß für den relativen Gehalt an Reparatur induzierten DNA Strangbrüchen verwendet.

2.2.5 Messung der Apoptose-Induktion nach Exposition gegenüber DNA reaktiven Substanzen (Annexin-V-Assay)

Nach Exposition gegenüber DNA-reaktiven Substanzen wurden jeweils 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen und mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Annexin-V-Bindepuffer aufgenommen. Je 100 µl Zellsuspension wurden in einem FACS-Röhrchen mit je 5 µl Annexin V und Propidium Iodid für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden nochmals 400 µl Bindepuffer zugefügt und die Proben innerhalb einer Stunde am Durchfluss-Zytometer analysiert.

2.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen (γ H2AX-Assay)

HAES-steril

HAES-steril 25 % (v/v)

in PBS

Fixierungs-Lösung

Paraformaldehyd 4,5 % (w/v)

in PBS; zum kompletten Lösen NaOH tropfenweise zugeben

P-Puffer

Tris-HCl (pH7,4) 100 mM

EDTA 50 mM

Triton X-100 0,5 % (v/v)

20x SSC

NaCl 3 M

NaCitrat 300 mM

Block-Puffer

BSA 3 % (v/v)

Tween 20 0,1 % (v/v)

in 4x SSC

Wasch- und Blockierungs-Lösung

FCS 1 %

(Tween 20 0,1 %)

in PBS

DNA-Färbelösung

DAPI-Stocklösung

12 µl

in 100 ml PBS

Behandelte Zellen wurden mit einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml in HAES-steril aufgenommen; je 10 µl der Zellsuspension wurden auf ImmunoSelect Adhäsionsobjektträger aufgebracht und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei RT in Paraformaldehyd fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger für 15 min bei RT in P-Puffer lysiert. Nach zwei weiteren Wasch-Schritten wurden die Proben über Nacht (alternativ Lagerung bei 4 °C) in Block-Puffer inkubiert. Nach drei 10-minütigen Blockierungsschritten in PBS/FCS wurden 300 µl Primär-Antikörper (maus-anti-phospho-Histon H2AX, 1:200 in PBS/FCS/Tween 20) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach weiteren drei Wasch- und Blockierungsschritten wurde der Sekundär-Antikörper (goat-anti-mouse-Alexa Fluor488, 1:400) für 90 min bei RT aufgetragen. Die DNA wurde nach dreimaligem Waschen (PBS/FCS) mit DAPI gegengefärbt, die Objektträger abschließend zweimal in PBS gewaschen und mit ImmunoMount eingedeckt.

2.2.7 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Hybridisierung auf Oligonukleotid-Microarrays (Affymetrix HG-U133A)

Aufgereinigte Zellen wurden bis zur RNA-Isolierung in RLT-Puffer („RNeasy Kit“) bei -80 °C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy Midi Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert; die RNA-Konzentration wurde mit dem „RiboGreen RNA Quantitation Kit“ am Fluoreszenzreader bestimmt und die Qualität der RNA im Agarosegel (1%) überprüft.

Zur Erststrang („first strand“)-cDNA-Synthese wurden 9 µl (13,5 µg) Gesamt-RNA mit 1 µl polyadenylierter Kontroll-RNA und 1 µl 100 µM T7-oligo(dT)₂₄ Primer (5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3') für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt. Danach wurden 4 µl 5x „first strand“-Puffer, 2 µl DTT und 1 µl 10mM dNTPs hinzugefügt und die Reaktion für

2 min bei 42 °C vorinkubiert. Nach Zugabe von 2 µl (200 U) Superscript II wurde die Inkubation für 1 h bei 42 °C fortgeführt.

Für die Zweitstrang („second strand“)-Synthese wurden 30 µl 5x „second strand“-Puffer, 91 µl RNase freies Wasser, 3 µl 10 mM dNTPs, 4 µl (40 U) *Escherichia coli* DNA Polymerase I, 1 µl (12 U) *E. coli* DNA Ligase und 1 µl RNase H zum Erststrang-Synthesemix hinzugefügt und für 2 h bei 16 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 µl (10 U) T4 DNA Polymerase I und Inkubation für weitere 5 min bei 16 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die doppelsträngige cDNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert; die wässrige Phase wurde mittels „Phase-Lock Gel Separation“ aufgereinigt. Nach der Präzipitation wurde die cDNA in 12 µl RNase freiem Wasser aufgenommen.

Biotinylierte cRNA wurde aus 5 µl doppelsträngiger cDNA mit Hilfe des „BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kits“ hergestellt und mit dem „RNeasy Mini Kit“ aufgereinigt. Fragmentierung der cRNA, Hybridisierung auf Affymetrix HG-U133A Mikroarrays sowie Waschen, Färben und Scannen der Arrays wurden wie im „*Affymetrix Gene Expression Analysis Technical Manual*“ beschrieben durchgeführt. Die Bewertung der Fluoreszenzsignale der Arrays wurde durch zwei verschiedene Algorithmen durchgeführt (s. 2.2.8).

2.2.8 Bestimmung der Signalintensitäten (Affymetrix HG-U133A)

Microarray Suite (MAS, Vers. 5.0)

Affymetrix hat auf seinen Microarrays erstmals das Prinzip der so genannten „Probesets“ eingeführt: Ein Gen wird durch eine paarweise Kombination aus 11-20 „perfect match“ (PM)- und „mismatch“ (MM)-Oligonukleotiden auf der Oberfläche der Arrays repräsentiert. Die „perfect match“-Sequenzen decken dabei einen etwa 300-600 bp langen Bereich am 3'-Ende der bekannten Gensequenz ab, während in die korrespondierenden mismatch-Oligonukleotide jeweils eine Punktmutation eingeführt wurde, um unspezifische Hybridisierung zu detektieren.

Der Algorithmus der „*Microarray Suite*“-Software von Affymetrix berechnet aus den Signalintensitäten bzw. den Hybridisierungseffizienzen an den einzelnen Oligonukleotidpaaren des Probesets zunächst die Differenz von PM- und MM-

Hybridisierungssignalen. Anschließend wird ein „Discrimination score“ ($R = [PM-MM] / [PM+MM]$) ermittelt. Dieser Wert wird für jedes einzelne Probenpaar eines Probesets bestimmt und nähert sich 1 an, je höher das PM-Signal über dem MM-Signal liegt. Aufgrund einer statistischen Bewertung wird ein so genannter „detection call“ für das gesamte Probeset vergeben. Bei p-Werten unter 0,04 bekommt das Probeset einen „present call“ (P) und ist damit als zuverlässig detektierbar gekennzeichnet, während bei p-Werten über 0,06 ein „absent call“ (A) ausgegeben wird. Dazwischen liegende p-Werte kennzeichnen eine marginale (M) Detektierbarkeit (siehe *Statistical Algorithms Reference Guide*, www.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical_reference_guide.pdf).

Die Normalisierung aller mit MAS ausgewerteten Arrays erfolgte global, indem der getrimmte Mittelwert der Signale aller Probesets des gesamten Arrays auf eine Durchschnittsintensität von 1000 normiert wurde, um Varianzen in der cRNA-Menge und -Qualität bzw. andere experimentelle Variablen nicht-biologischen Ursprungs zu kompensieren.

RMAexpress (Vers. 04alpha7)

Alternativ zu MAS kann die Bewertung der Hybridisierungssignale an den Probesets auch nach der „Robust Multichip Average“ Methode (RMA) erfolgen (Irizarry *et al.*, 2003). Nach einer Hintergrundkorrektur und Quantilnormalisierung (Bolstad *et al.*, 2003) berücksichtigt diese Methode nur die Hybridisierung an den „perfect matches“ der Probesets, so dass hier keine „detection calls“ vergeben werden. Der RMA-Algorithmus ist im Bereich der niedrigen Signalintensitäten deutlich sensitiver als der MAS-Algorithmus, da er gerade dort zu einer Verminderung der falsch-positiven Ereignisse führt und sich somit besser zur Quantifizierung von seltenen RNAs eignet.

2.2.9 Fluoreszenzmarkierung von cDNA und Hybridisierung auf Oligonukleotid-Microarrays (MWG Custom Array “DNA-Reparatur-Chip”)

Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese (s. 2.2.7) wurde Fluoreszenz markierte cRNA unter Verwendung des „MEGAscript T7 Kits“ hergestellt. Dazu wurde die cDNA in 25 µl Ansätzen in 1x Reaktionspuffer mit je 25 mM dATP, dCTP und dGTP, 50 mM dUTP, 5mM Cy5-dUTP, 2µl Enzym-Mix und 5 µl T7 RNA-Polymerase für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die so markierte cRNA wurde gereinigt („High Pure RNA Tissue Kit“) und fragmentiert. Die Hybridisierung der cRNA auf MWG DNA-Reparatur-Arrays erfolgte in 200 µl 1x Hybridisierungspuffer mit 25 µl Kontroll-Oligonukleotid-Mix für 42 h bei 42 °C in feuchten Hybridisierungskammern. Danach wurden die Arrays für je 5 min in 2x SSC / 0,1 % SDS, 1x SSC und 0,5x SSC bei 30 °C gewaschen und anschließend getrocknet. Die Arrays wurden von MWG Biotech gescannt und die resultierenden Signale mit Hilfe der *MAVI* Software normalisiert.

2.3 Abkürzungen

A	Absent (call)
ABC	ATP Binding Cassette
AP-	Apurin-
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
CLB	Chlorambucil
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CS	Cockayne's Syndrom
CYP	Cytochrom P450
DME	Drug Metabolizing Enzyme
DNA-PK	DNA abhängige Proteinkinase
DSB	Doppelstrangbruch
DTIC	Dimethyl-trizeno-imidazol-Carboxamid
ENU	EthylNitrosoharnstoff
FA	Fludarabin
FDR	False Discovery Rate
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GGR	Globale Genom-Reparatur
GO	Gene Ontology
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colon-Cancer
HR	Homologe Rekombination
MAS	Microarray Suite
MDR	Multi Drug Resistance
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MM	Mismatch
MMR	Mismatch-Reparatur
MNU	MethylNitrosoharnstoff
Mx	Methoxyamin
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur

NHEJ	Non-Homologous End-Joining
OTM	Olive Tail Moment
P	Present (call)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PI	Propidium Iodid
PM	Perfect Match
PS	Phosphatidylserin
R	Discrimination Score
RIN	Relevance Interaction Network
RMA	Robust Multichip Average
RT	Raumtemperatur
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SEM	Standard Error of the Mean
TCR	Transkriptions-gekoppelte Reparatur
XP	Xeroderma Pigmentosum

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von CLL-Patienten

Alle CLL-Patienten, von denen Zellproben im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurden nach Aktenlage bezüglich ihrer klinischen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasste Patienten, die bisher entweder keine Chemotherapie zur Behandlung der CLL erhalten oder die auf eine Chlorambucil-Therapie mit einer Reduktion der peripheren Lymphozytenzahlen auf Normalwerte reagiert hatten. Die zweite Gruppe enthielt Patienten, deren Tumorzellen auf eine Behandlung mit Chlorambucil nicht mehr ansprachen und deshalb eine Alternativ-Chemotherapie mit Fludarabin erhalten hatten. In dieser Gruppe befanden sich auch Patienten mit multiresistenter CLL, die weder auf Chlorambucil- noch auf Fludarabin-Therapie ansprachen. Die Tumorzellen aller analysierten CLL-Patienten hatten die Chemotherapie-Resistenz im Lauf von mehreren Behandlungszyklen erworben; Fälle von primärer Resistenz wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die erste Patientengruppe wird im Folgenden als „sensitiv“, die zweite als „resistent“ bezeichnet.

3.2 Funktionelle Untersuchung der DNA-Reparaturleistung von CD19⁺ CLL-Lymphozyten

3.2.1 Bestimmung der DNA-Strangbruchprozessierung von CD19⁺ CLL-Lymphozyten nach ENU-Exposition

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass mononukleäre CLL-Zellen von Chemotherapie resistenten Patienten eine schnellere funktionelle DNA-Reparaturkapazität gemessen an der DNA-Strangbruchprozessierung aufweisen (Müller *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1997; Buschfort *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der Reparaturgen-Expression von hoch

aufgereinigten CD19⁺ CLL-Lymphozyten und der funktionellen Reparaturkapazität nach *ex vivo*-Exposition dieser Zellen gegen DNA schädigende Agenzien mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) untersucht werden.

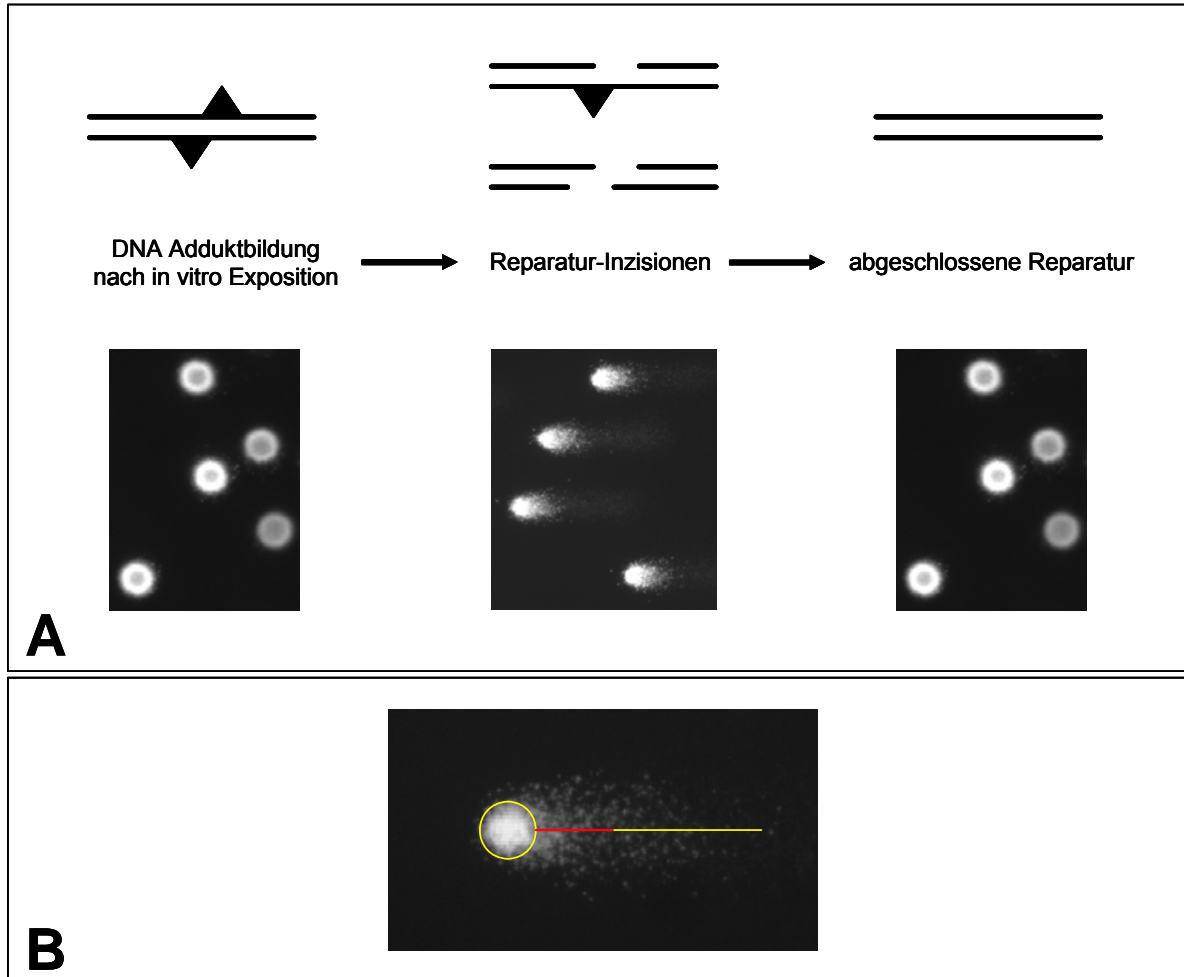


Abb. 3: Nachweis von Reparatur induzierten Strangbrüchen mit der alkalischen Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay). A) Nach *in vitro*-Exposition z.B. gegen ENU werden an der DNA eine Reihe verschiedenartiger Addukte gebildet, die durch Reparatur-Inzisionen unterschiedlicher DNA-Reparatursysteme entfernt werden können. Die entstehenden Reparaturlücken werden abschließend durch Re-Ligation verschlossen (obere Reihe). Im alkalischen Comet Assay werden sekundäre, Reparatur induzierte Einzel- und Doppelstrangbrüche durch die elektrophoretische Mobilität der DNA-Fragmente sichtbar gemacht (untere Reihe, Mitte). Nach abgeschlossener Reparatur ist die intakte nukleäre DNA wiederhergestellt (untere Reihe, rechts). **B)** Quantitative Messung der Reparatur induzierten DNA-Fragmentierung durch Bestimmung des „Olive Tail Moment“ (OTM). Das OTM beschreibt das Produkt aus dem DNA-Gehalt im Kometenschweif und dem Abstand zwischen Kometenkopf und der Hauptfluoreszenz im Kometenschweif (rot).

Die Einzelzell-Gelelektrophorese wurde dabei verwendet, um Strangbrüche in der nukleären DNA individueller Zellen nachzuweisen. Einzelstrangbrüche entstehen entweder „spontan“, beispielsweise an destabilisierten abasischen Stellen, sehr viel häufiger aber intermediär während zellulärer DNA-Reparaturprozesse. Zu

zeitweiligen Einzelstrangbrüchen führt u. a. das Ausschneiden von modifizierten Basen durch DNA-Glykosylasen mit anschließender Inzision des verbleibenden Zucker-Phosphat-Rückgrates durch Endonukleasen im Rahmen des BER-Weges. Andererseits können Einzelstrangbrüche auch durch direktes Entfernen von einzelnen beschädigten Nukleotiden oder von ganzen Nukleotidsequenzen durch Multi-Enzymkomplexe im Rahmen der NER gebildet werden. Doppelstrangbrüche hingegen treten entweder ohne Enzym-Beteiligung direkt nach physikalischer Beschädigung der DNA z.B. durch ionisierende Strahlung oder durch die Aktivität des Mismatch-Reparatursystems während der Replikation auf. Unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 11$), die zu einer partiellen Denaturierung der DNA führen, detektiert der Comet Assay sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche, während die „neutrale,“ Variante ($\text{pH} \sim 8$) nur Doppelstrangbrüche anzeigt. Durch die Wanderung der entstandenen unterschiedlich großen DNA-Fragmente im elektrischen Feld während der Elektrophorese entstehen schließlich die typischen, kometenartigen Verteilungen der Kern-DNA (Abb. 3A).

Um die globale DNA-Reparaturkapazität einer Zelle funktionell zu erfassen, eignet sich der Comet Assay insbesondere in Kombination mit DNA reaktiven Agenzien, die ein möglichst breites Schadensspektrum erzeugen. Eine solche Substanz ist der monoalkylierende Ethylnitrosoharnstoff ENU, der unter physiologischen Bedingungen sehr schnell ($t_{1/2}$: 8 Minuten) zu hoch reaktiven Karb-Anionen zerfällt (Goth und Rajewsky, 1972), die sofort mit nukleophilen Zentren in der DNA reagieren. Die so genannten Addukte, die nach ENU-Exposition an der DNA gebildet werden, sind sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer relativen Häufigkeit sehr gut charakterisiert (Beranek, 1990). Als Hauptprodukt finden sich die chemisch und biologisch weitgehend stabilen Phosphotriester (ca. 55 %), während mit geringerer Häufigkeit Alkylierungen an N- und O-Atomen der Basen erfolgen: Zu etwa 11 % werden N7-Ethyl-Guanine, zu 8 % O⁶-Ethyl-Guanine, zu 7,5 % O²-Ethyl-Thymine und zu 4 % N3-Ethyl-Adenine gebildet. Diese DNA-Addukte sind Substrate für verschiedene DNA-Reparatursysteme, so dass die kumulative Inzisionsrate nach Alkylierung durch ENU sowie die benötigte Zeit für das Wiederverschließen der Strangbrüche ein gutes Maß für die Gesamt-Reparaturleistung einer Zelle sind.

Als Anhaltspunkt für die relative Zahl von DNA Strangbrüchen nach ENU-Exposition wurde in früheren Studien der Arbeitsgruppe die von den DNA Fragmenten gebildete Fläche verwertet. Da sich in der neueren Literatur aber immer deutlicher das so

genannte „Olive Tail Moment“ OTM durchgesetzt hat (Olive *et al.*, 1990; Olive und Banath, 1993), wurde diese Maßeinheit während dieser Arbeit im Labor in eine weiterentwickelte Bildanalyse-Software (ACAS ICM) implementiert und für die quantitative Auswertung der Comet Assays verwendet. Das Olive Tail Moment beschreibt dabei das Produkt aus dem DNA-Gehalt im Kometenschweif und dem Abstand zwischen Kometenkopf und der Hauptfluoreszenz im Kometenschweif (Abb. 3B).

Als Maß für die Reparaturgeschwindigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit die Zeit berechnet, die die Zellen benötigen, um 50 % der initialen Strangbrüche zu prozessieren. Außerdem wurde ein alternatives Maß definiert, das die Abnahme des OTM-Wertes und damit die Reparaturgeschwindigkeit pro Minute darstellt. Durch die kurze Halbwertszeit und die rasche Reaktion der Zerfallsprodukte des ENU mit der DNA repräsentierte diese Reduktion des OTM weitgehend echte DNA-Reparaturvorgänge, die nicht durch die anhaltende Neubildung von DNA-Addukten im Beobachtungszeitraum überlagert wurden (Abb. 4A).

Mit dieser Technik wurden Reparaturkinetiken von CD19⁺ CLL-Tumorzellproben von elf sensitiven sowie neun resistenten Patienten aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit ENU (150 µg/ml) unterschieden sich die Mittelwerte der initialen Strangbruchraten zu Beginn des Beobachtungszeitraumes zwischen den beiden Patientengruppen (Abb. 4B). Dieser Befund deutet auf eine erhöhte Inzisionskapazität der resistenten Zellproben während der frühen Schritte der DNA-Reparatur hin. Die Endpunkte der Reparatur nach 90 Minuten waren hingegen bei beiden Gruppen identisch (Abb. 4B). Daraus folgt, dass die mittlere Reparatur-Halbwertszeit bei den Zellen sensibler Patienten mit etwa 104 Minuten höher lag als bei denen der resistenten Gruppe mit 73 Minuten (Abb. 4C). Außerdem war auch die mittlere Reparaturgeschwindigkeit (OTM/min, Abb. 4D) in der sensitiven Patientengruppe mit 33 pro Minute verglichen mit 58 pro Minute bei resistenten Patienten deutlich langsamer. Betrachtete man andererseits die Messwerte für die einzelnen Patienten, fanden sich starke interindividuelle Schwankungen: So enthielt z.B. die sensitive Patientengruppe auch immer individuelle Proben, die in ihrer schnellen Reparaturcharakteristik mehr den resistenten Zellen ähnelten und umgekehrt.

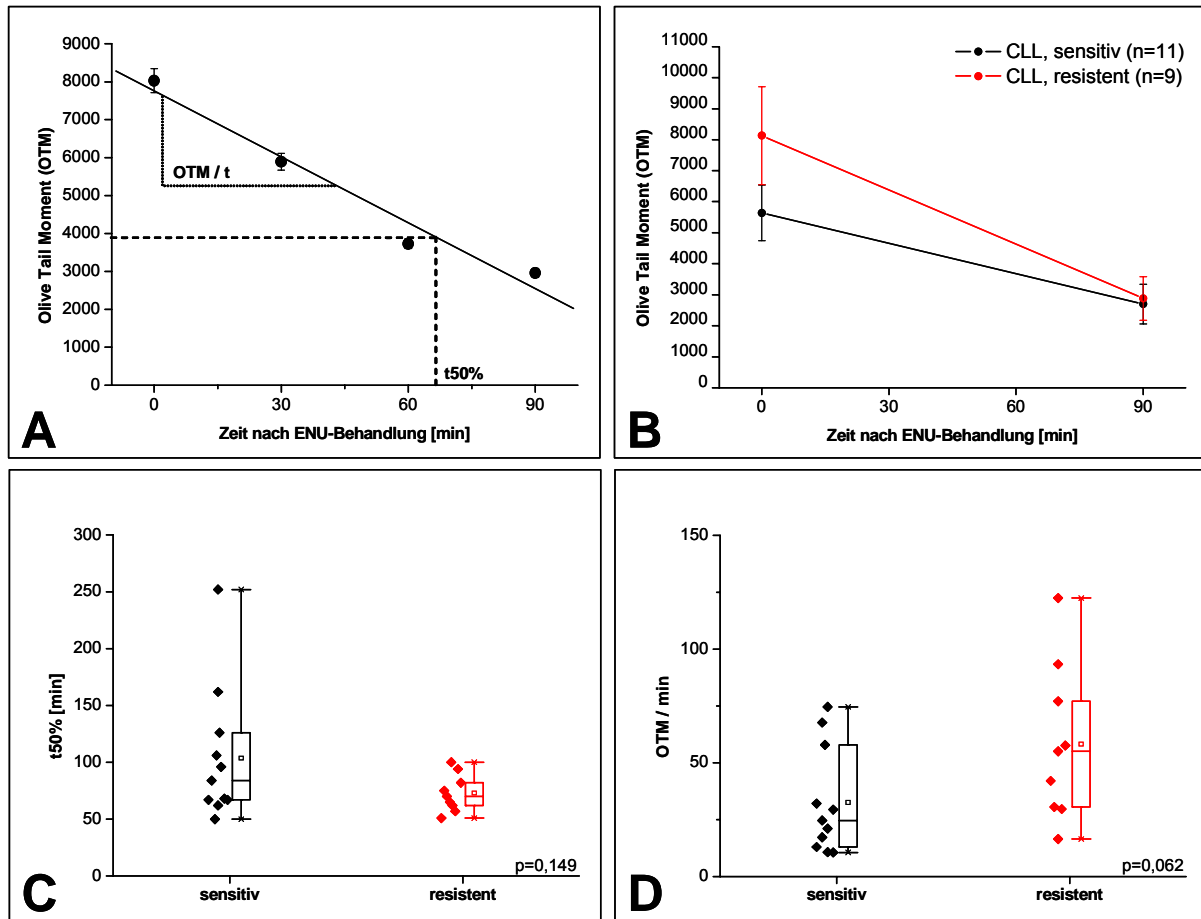


Abb. 4: Funktionelle Reparaturcharakteristiken von CD19⁺ CLL-Lymphozyten. **A)** Typische DNA-DNA-Reparaturkinetik, gemessen mit dem alkalischen Comet Assay nach ENU-Exposition. CD19⁺ CLL-Lymphozyten wurden 30 min mit ENU (150 µg/ml) behandelt; in der folgenden Reparaturphase wurde alle 30 min ein Zellaliquot entnommen und in Agarose eingebettet. Zur Bewertung der Reparatureffizienz verschiedener Tumorzellproben wurde die Zeit bestimmt, die für die Reparatur von 50 % der initialen Strangbrüche benötigt wurde (t50%); alternativ wurde die Abnahme des OTM pro Minute (OTM/t) und somit die Geschwindigkeit der Strangbruchprozessierung errechnet. **B)** Mittelwerte (+/- SEM) der initialen Strangbruchraten bzw. der Strangbruchraten zum Ende der Reparaturinkubation nach 90 min für elf sensitive und neun resistente Tumorzellproben. **C)** Verteilung der t50%-Werte bzw. **D)** der Reduktion des OTM/min bei elf sensitiven und neun resistenten Tumorzellproben. Box: 25-75% Quartile; Whisker: Spannweite; Quadrat innerhalb der Box: Mittelwert; Linie innerhalb der Box: Median.

3.2.2 Modulierung der DNA-Strangbruchprozessierung von CD19⁺ CLL-Lymphozyten

Die in Abb. 4A gezeigte Reaktion der gereinigten CLL-Zellen auf ENU induzierte DNA-Schädigung kann durch kleine, pharmakologisch wirksame Reparatur-Inhibitormoleküle moduliert werden. So wirkt beispielsweise der Methylether Methoxyamin (Mx) als potenter Inhibitor der frühen Schritte der Basen-Exzisions-

Reparatur (Liuzzi und Talpaert-Borle, 1985; Taverna *et al.*, 2001). Die zuständige DNA-Glykosylase schneidet eine beschädigte Base aus und hinterlässt eine abasische Stelle. Methoxyamin reagiert mit der offenen Ringstruktur der Desoxyribose, wodurch die Inzision der 5' Phosphodiesterbindung des betroffenen DNA-Stranges durch die AP-Endonuklease und in der Folge die gesamte weitere Prozessierung des DNA-Schadens unterbunden wird (s. Abb. 1). Eine Ko-Inkubation mit Mx führt also zu einer Verringerung der im Comet Assay detektierbaren Strangbrüche um den BER bedingten Anteil (Abb. 5).

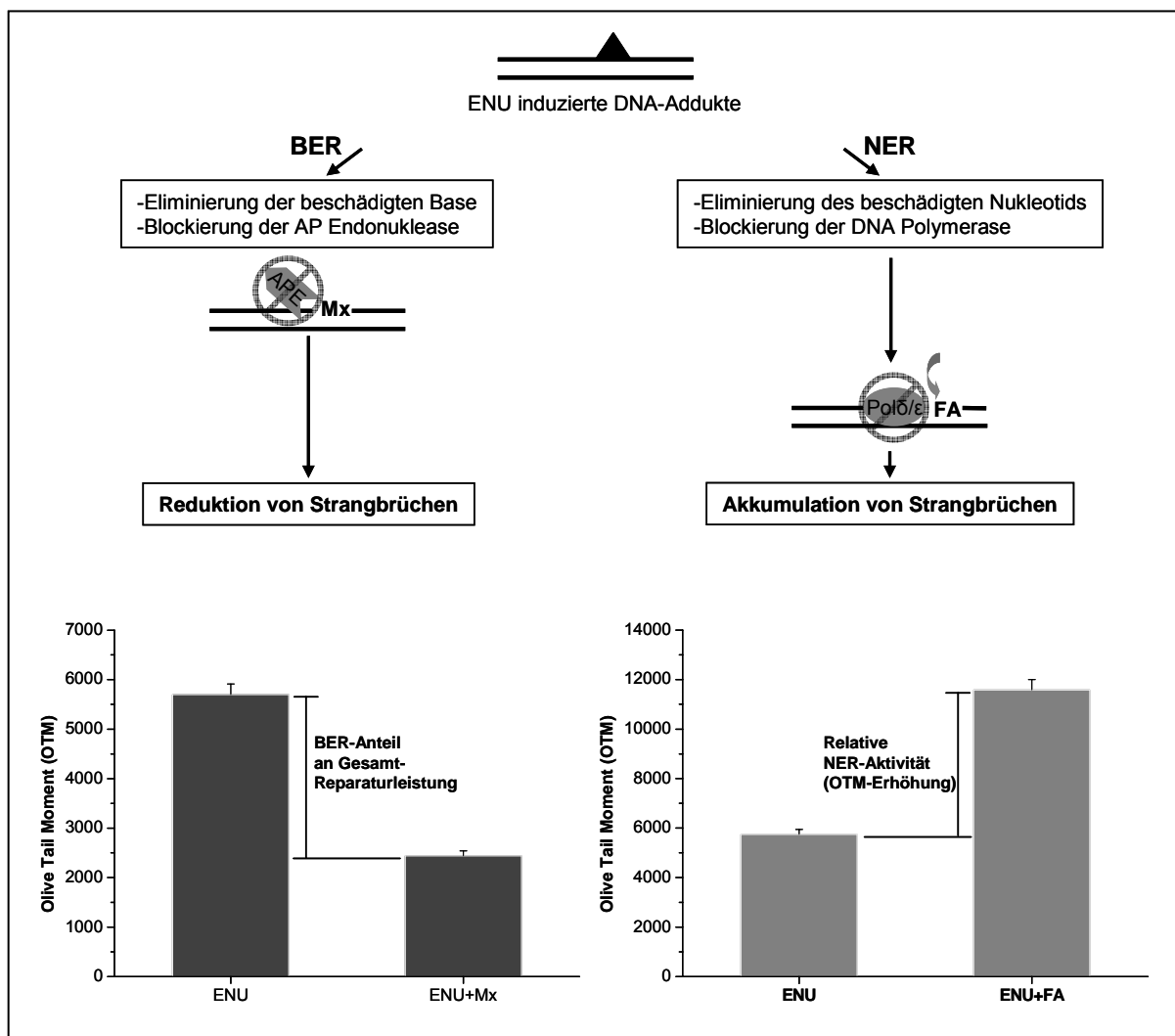


Abb. 5: Modulation der DNA-Reparatur durch Methoxyamin (Mx) und Fludarabin (FA). ENU induzierte DNA-Addukte werden über verschiedene Reparatursysteme repariert, die spezifisch moduliert werden können. Frühe Schritte der BER werden durch den Einbau von Mx und damit verbundener Blockierung der AP-Endonuklease inhibiert. Dies führt zu einer Reduktion des OTM im Comet Assay nach kombinierter ENU- und Mx-Exposition (= BER-Anteil an der Gesamt-Reparaturleistung, links). Das Verschließen von Reparatur induzierten Strangbrüchen in späten Schritten der NER wird durch die Blockierung der DNA-Polymerase durch FA verhindert und führt zu einer im Comet Assay messbaren Akkumulation von Strangbrüchen (= relative NER-Aktivität, ausgedrückt in der Erhöhung des OTM gegenüber alleiniger ENU-Exposition, rechts).

Das Nukleotid-Analoge Fludarabin (FA) wirkt in replizierenden Zellen durch Inhibition von DNA-Polymerasen während der S-Phase des Zellzyklus. In ruhenden Zellen hingegen konnte eine Interaktion von Fludarabin mit der Nukleotid-Exzisions-Reparatur gezeigt werden: Nachdem ein beschädigtes Nukleotid zusammen mit etwa 24 - 32 benachbarten Nukleotiden entfernt wurde, bewirkt der Einbau von Fludarabin in die durch Polymerasen neu synthetisierte DNA-Sequenz einen Abbruch der Polymerisierungsreaktion (Keating *et al.*, 1994; Yamauchi *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2002) (s. Abb. 1). Dies führt zu einer Anhäufung von nicht wieder verschlossenen DNA-Reparaturintermediaten und damit zu einer Erhöhung der Strangbruchrate im Comet Assay (Abb. 5). Mit Hilfe dieser beiden Modulatoren lässt sich also der Anteil bestimmter Reparaturwege an der funktionellen Gesamt-Reparaturleistung einer Zelle abschätzen.

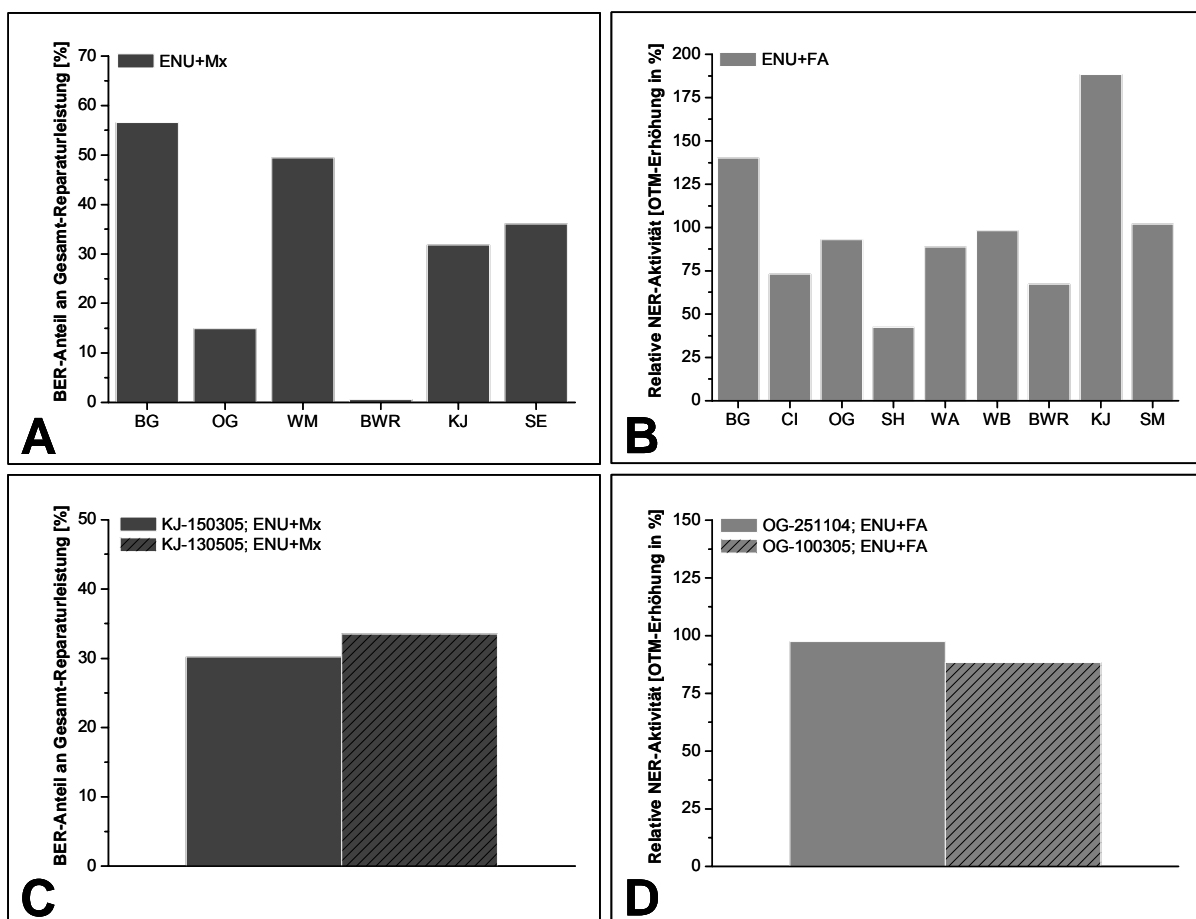


Abb. 6: Relative Aktivität verschiedener DNA-Reparaturwege in CD19⁺ CLL-Lymphozyten nach ENU-Exposition. CLL-Tumorzellen wurden jeweils 1 h mit bzw. ohne DNA-Reparaturmodulatoren (Mx: 1 mM bzw. FA: 1 µg/ml) vorinkubiert und anschließend für 30 min mit ENU (150 µg/ml) behandelt. Nach einer weiteren Stunde wurden die entstandenen Strangbrüche im Comet Assay quantifiziert. **A)** Anteil des BER-Systems an der Gesamt-Reparaturleistung nach ENU-Exposition; **B)** Relative Aktivität des NER-Systems nach ENU-Exposition (prozentuale Erhöhung des OTM-Wertes, s. Abb. 5). **C,D)** Reproduzierbarkeit der DNA-Reparaturmodulation in Tumorzell-Proben von individuellen CLL-Patienten.

CD19⁺ Lymphozyten von CLL-Patienten wurden jeweils eine Stunde vor der DNA-Schadensinduktion durch ENU mit Mx bzw. FA behandelt. Eine Stunde nach der ENU-Exposition (30 Minuten, s. 3.2.1) wurden die Zellen im Comet Assay auf Strangbrüche untersucht.

Nach DNA-Schadensinduktion durch ENU und Inhibition der Basen-Exzisions-Reparatur durch Methoxyamin wiesen die individuellen CLL-Tumorzellproben sehr unterschiedliche Verringerungen des OTM-Wertes auf. Dies deutete auf einen individuell unterschiedlichen BER-Anteil an der Gesamt-Reparaturleistung der untersuchten CLL-Proben hin (0,5 - 57 %, Abb. 6A).

Die Blockierung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur durch Fludarabin führte zu individuell ebenfalls sehr unterschiedlichen relativen Erhöhungen der Strangbruchraten in den einzelnen Zellproben (42 - 188 %, Abb. 6B). Daraus konnte geschlossen werden, dass auch die NER-Aktivitäten in den Tumorzellen einzelner Patienten bei der Prozessierung von DNA-Schäden erhebliche individuelle Unterschiede aufweisen.

Die experimentell ermittelte Beteiligung von BER und NER wurde durch wiederholte Analysen von Zellen des gleichen Patienten bestätigt (Abb. 6C,D), während konsistente Unterschiede in der Beteiligung bestimmter DNA-Reparaturwege zwischen sensitiven und resistenten CLL-Tumorzellproben hier nicht beobachtet werden konnten.

3.3 Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Tumorzellen

In der modernen Krebs-Forschung hat sich die Genexpressionsanalyse zu einem bedeutenden methodischen Ansatz entwickelt. Durch Untersuchung des so genannten Transkriptoms, das die Gesamtheit der als mRNA aktiv transkribierten Gene repräsentiert, können sowohl gesunde Zell- und Gewebetypen als auch deren abgeleitete Tumorvarianten voneinander unterschieden bzw. miteinander verglichen werden. Dies führte inzwischen dazu, dass z.B. Tumorentitäten, die bis vor kurzem aufgrund ihres Phänotyps als einheitlich angesehen wurden, nach der molekularen Charakterisierung ihrer Genexpression in mehrere distinkte Erkrankungen aufgeteilt wurden (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald und Staudt, 2003). Auf diese Weise werden eine zuverlässigere Diagnose und eine effektivere Behandlung ermöglicht (Staudt, 2003). Außerdem werden verschiedene Aktivitäts- oder Entwicklungszustände durch Änderungen im Transkriptom abgebildet. Des Weiteren reagiert die Zelle oder das Gewebe mit einer differentiellen Genexpression auf endogene oder exogene Einflüsse wie beispielsweise Stress oder eine Tumorthherapie mit Bestrahlung oder Zytostatika. Zur Untersuchung der globalen Genexpression werden heute meist DNA-Microarrays verwendet, die auf der Hybridisierung von mRNA- (bzw. daraus abgeleiteten cDNA- oder cRNA-Kopien) an immobilisierten DNA-Sequenzen basieren.

Die folgenden Abschnitte beschreiben Experimente, in denen mit Hilfe der Microarray-Technologie die Frage untersucht wurde, ob sich die Entwicklung einer Chemotherapie-Resistenz in einer Veränderung des Genexpressionsmusters von CLL-Tumorzellen widerspiegelt. Dabei galt das Hauptaugenmerk dem „DNA damage response“-Netzwerk mit insgesamt etwa 800 beteiligten Genen bzw. definierten Untergruppen dieses Netzwerkes (DNA-Reparaturgene sowie Apoptosegene und Zellzyklus regulierende Gene).

3.3.1 Auswahl einer Microarray-Plattform zur RNA-Expressionsanalyse

Zur Bearbeitung dieser Frage standen in der Arbeitsgruppe zwei alternative Microarray-Plattformen zur Verfügung, die zunächst auf ihre Eignung für eine serielle RNA-Expressionsanalyse untersucht wurden. Zum einen stand zu Beginn der Arbeit ein DNA-Reparatur-Array der Firma MWG Biotech zur Verfügung, der 155 ausgewählte DNA-Reparatur- sowie Apoptose- und Zellzyklus regulierende Gene abdeckte. Die betreffenden Gene wurden dabei durch jeweils drei Oligonukleotide von 50 Nukleotiden Länge repräsentiert (die so genannten „Originale“), die das 5'-Ende bzw. das 3'-Ende sowie den mittleren Bereich der entsprechenden mRNA-Sequenz abdeckten. Auf dem Array war jedes Oligonukleotid zusätzlich als „Replikate“ vorhanden (Abb. 7). Diese Version des MWG-Arrays wurde in dieser Arbeit mit 33 weiteren wichtigen, teilweise neu beschriebenen DNA-Reparaturgenen aktualisiert (Wood *et al.*, 2001). Wegen einer Umstrukturierung der Array-Produktion bei MWG wurden die aktualisierten Gene allerdings nur noch durch ein einzelnes Oligonukleotid von 40 Nukleotiden Länge vertreten.

Zum anderen bestand die Alternative, Microarrays der Firma Affymetrix zu verwenden, die im BioChip-Labor des IFZ mittlerweile routinemäßig zur Bearbeitung verschiedenster Fragestellungen eingesetzt werden.

Um herauszufinden, welche Plattform für die serielle Analyse des DNA-Reparatur-Transkriptoms von Tumorzellen die zuverlässigsten Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit erbringt, wurden mononukleäre Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) eines CLL-Patienten über einen Ficoll-Dichtegradienten aufgereinigt, die Gesamt-RNA isoliert und mit oligo-(dT) primern in cDNA umgeschrieben; dieser cDNA-Pool basierte also nur auf dem mRNA-Anteil der isolierten Gesamt-RNA. Anschließend wurde diese cDNA mittels *in vitro*-Transkription in cRNA umgeschrieben, dabei mit Cy5 Fluoreszenz-markiert und die markierte cRNA auf zwei MWG DNA-Reparatur-Arrays hybridisiert.

In einer ersten Analyse zeigte sich, dass die Hybridisierung über die gesamte Fläche der Arrays sehr ungleichmäßig erfolgte, so dass sich für Original- und Replikat-Oligonukleotide große Unterschiede in den Signalintensitäten ergaben. Außerdem wiesen manche Areale eine sehr hohe Hintergrund-Fluoreszenz auf (Abb. 7).

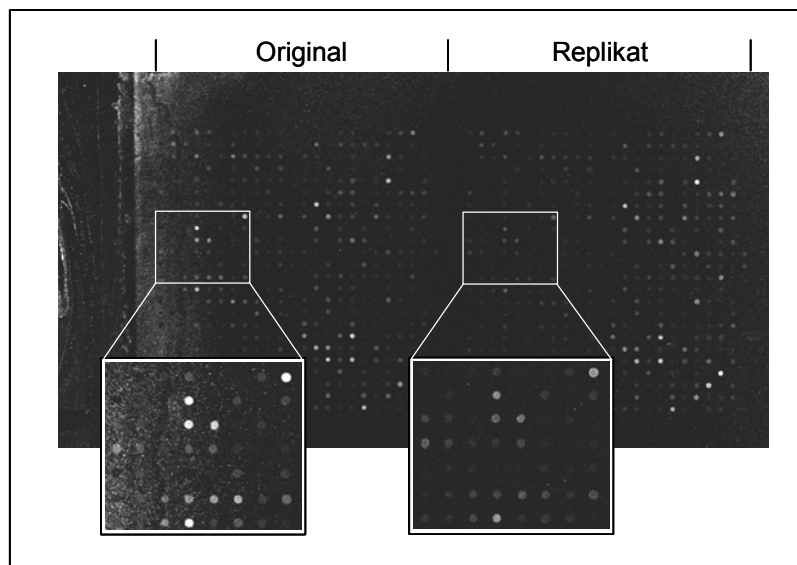


Abb. 7: Hybridisierung auf MWG DNA-Reparatur-Arrays. Der Array ist in zwei identisch mit Oligonukleotiden bestückte Areale (Original und Replikat) aufgeteilt. Deutlich sind die ungleichen Signalintensitäten zwischen redundanten Spots in den beiden Arealen erkennbar (Auschnitte). Außerdem verschwinden die Hybridisierungssignale am linken Rand des Chips im lokal erhöhten Hintergrundrauschen.

Um die Reproduzierbarkeit der MWG-Arrays untereinander zu untersuchen, wurden jeweils für beide Chips die Signale der drei Original-Oligonuklotide pro Gen gemittelt und die logarithmierten Mittelwerte gegeneinander aufgetragen (Abb. 8A).

Idealerweise sollte sich in der graphischen Darstellung eine Gerade ergeben: Die „Punktwolke“ in Abb. 8A legt nahe, dass allein der Hybridisierungsschritt im Fall der MWG-Arrays bereits so variabel war, dass die gleiche Probe auf zwei Chips nur eine sehr schwache „Spearman rank“-Korrelation von 0,6 erreichte. Im Vergleich dazu brachte die gleiche Analyse mit vier unterschiedlichen, bereits im Vorfeld dieser Arbeit auf Affymetrix HuGeneFL Chips hybridisierten CLL-Proben (Dürig *et al.*, 2003) wesentlich bessere Korrelationen um 0,9 (Abb. 8B).

Aufgrund der auch aus früheren Arbeiten mit MWG DNA-Reparatur-Arrays bekannten hohen Hintergrundfluoreszenz sowie einer generell ungleichmäßigen Hybridisierung schien die MWG-Arrayplattform für die serielle Analyse des RNA-Expressionsmusters von Tumorzellproben wenig geeignet. Außerdem wurde die vergleichende Analyse der Signalintensitäten durch die Umstellung der Array-Produktion bei MWG (50mer gegen 40mer; drei gegen ein Oligonukleotid pro Gen) nahezu unmöglich gemacht.

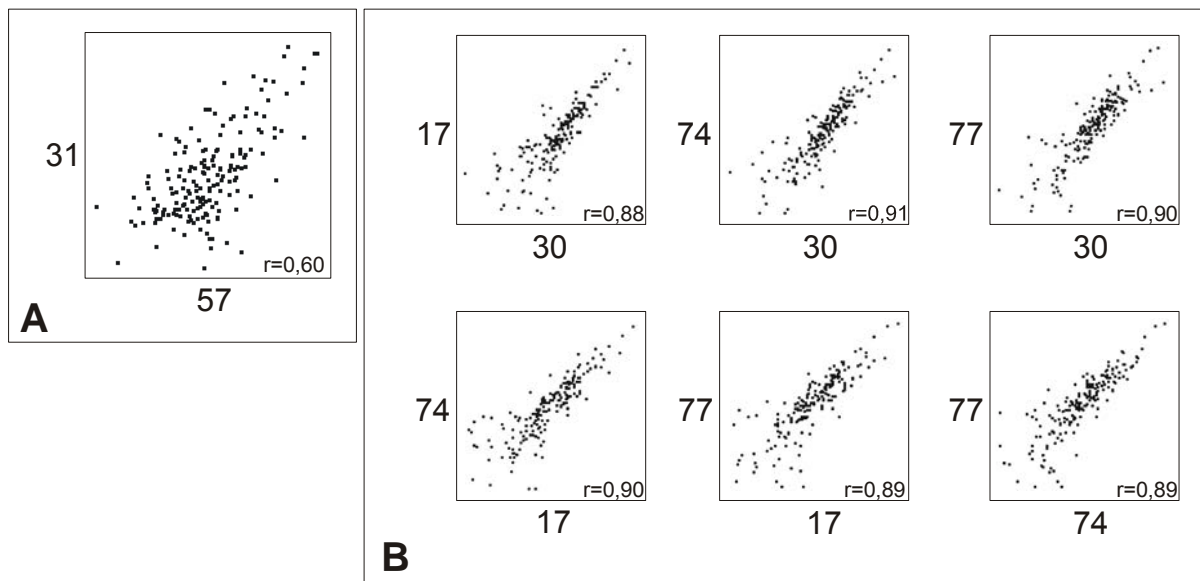


Abb. 8: Reproduzierbarkeit der Hybridisierung auf zwei verschiedenen Microarray-Plattformen.
A) Cy5-markierte cRNA aus einer CLL-Tumorzellprobe wurde auf zwei MWG-Arrays (Nr. 31 und 57) hybridisiert. Die logarithmierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten an den drei Oligonukleotiden, die ein Gen repräsentieren, wurden für beide Arrays gegeneinander aufgetragen. **B)** Hybridisierung von vier verschiedenen CLL-Tumorzellproben auf vier Affymetrix HuGeneFL Microarrays (Nr. 17, 30, 74, 77). Die logarithmierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten von 1-5 „Probesets“ (s. 2.2.8), die eine Gensequenz repräsentieren, wurden für die vier Arrays gegeneinander aufgetragen. In A) und B) wurden jeweils die gleichen Gene analysiert. r = Spearman'scher Rangkorrelations-Koeffizient.

Mit der Affymetrix-Plattform standen auf der anderen Seite echte „whole genome“ Microarrays zur Verfügung, die neben der Analyse des DNA-Reparatur-Transkriptoms bei Bedarf zusätzlich einen Einblick in die RNA-Expression weiterer interessanter Genfamilien und Funktionswege erlaubten und deren serielle Analyse nach standardisierten Protokollen im Institut etabliert war. Deshalb wurde für diese Arbeit schließlich die Affymetrix-Plattform zur Untersuchung der Genexpressionsmuster von CLL-Tumorzellen gewählt.

3.3.2 Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Lymphozyten im Hinblick auf die Chemosensitivität

3.3.2.1 Retrospektive RNA-Expressionsanalyse von mononukleären CLL-Zellen

Um zu untersuchen, ob sich die klinische Chlorambucil-Resistenz der CLL-Patienten und ein gegebenenfalls damit gekoppeltes verändertes DNA-Reparaturverhalten der Tumorzellen in ihrem Genexpressionsmuster widerspiegelt, wurde zunächst ein Microarray-Datensatz von 78 CLL-Proben retrospektiv ausgewertet. Die aus nicht weiter gereinigten peripheren mononukleären Zellen isolierte RNA war bereits im Rahmen einer Studie zur Prognose der CLL auf zwei Serien von Affymetrix HuGeneFL Arrays hybridisiert worden (Dürig *et al.*, 2003); die Auswertung der Signalintensitäten war mit der Affymetrix Software „*Microarray Suite*“ (MAS, s. 2.2.8) erfolgt.

Die CLL-Patienten wurden bezüglich ihres klinischen Ansprechens auf die jeweilige Therapie charakterisiert und in zwei Gruppen eingeteilt (s. 3.1). Fünfzehn Patienten wurden wegen Zweit-Tumorerkrankungen oder ähnlicher Komplikationen in ihrem klinischen Verlauf von der Analyse ausgenommen. Von den verbleibenden 63 Patienten befanden sich 52 in der sensitiven und elf in der resistenten Gruppe (Tab. 1).

Tab. 1: Gruppenzugehörigkeit der retrospektiv analysierten CLL-Patienten

Status	Alle Arrays (63)		Serie 1 (32)		Serie 2 (31)	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
sensitiv	52	82,5	29	90,6	23	74,2
resistent	11	17,5	3	9,4	8	25,8

Im Verlauf der Analyse zeigte sich, dass bei einem „unsupervised clustering“, d.h. bei einer hierarchischen Anordnung der Arrays anhand der Signalintensitäten der so genannten „Probesets“ (s. 2.2.8), keine Aufteilung der Arrays in sensitive und resistente Patienten erzielt werden konnte, sondern eine scharfe Trennung bezüglich der beiden Chip-Serien erfolgte („chip bias“). Da eine solche, auf die Fabrikation der Arrays zurückzuführende Eigenschaft eine gemeinsame Analyse aller 63 Datensätze unmöglich machte, wurden in der Folge nur die Datensätze der Serie 2 untersucht.

Nach einer Neustrukturierung des Datensatzes gemäß den beiden CLL-Gruppierungen wurden die Gruppen-Mediane der Fluoreszenzintensitäten an den einzelnen Probesets sowie deren Verhältnis (relative Expressionsänderung) gebildet. Als statistische Bewertung diente der Wilcoxon-Rangsummentest. Probesets wurden als differentiell exprimiert angesehen, wenn sie in mindestens 20 % aller Proben vom Affymetrix-Algorithmus als „present“, d.h. zuverlässig detektierbar, bewertet wurden, eine relative Änderung von mindestens 1,5 und einen p-Wert im Wilcoxon-Test von höchstens 0,05 aufwiesen. Um der relativen Expressionsänderung nicht zu großes Gewicht beizumessen, wurden außerdem Probesets mit einem p-Wert von $<0,005$ unabhängig vom Wert der Änderung als differentiell exprimiert akzeptiert.

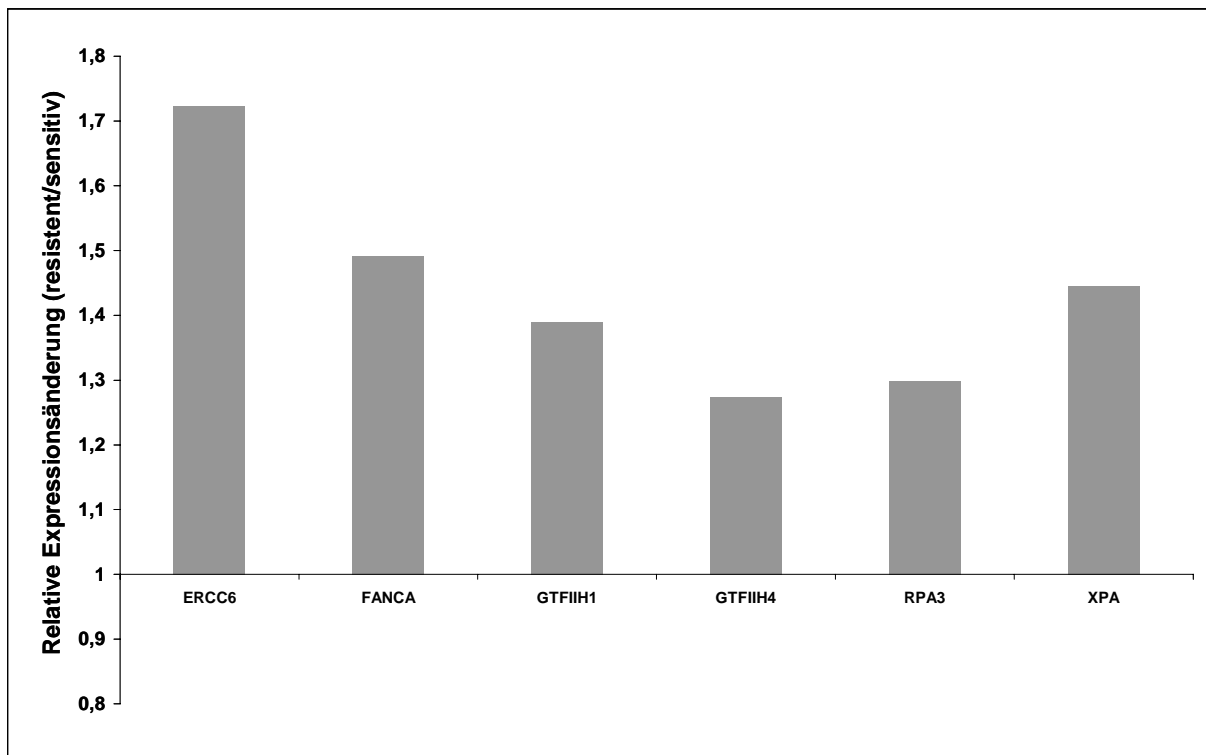


Abb. 9: „Supervised“ RNA-Expressionsanalyse von 31 CLL-Tumorzellproben. Affymetrix HuGeneFL-Datensätze von 23 sensitiven und acht resistenten Ficoll gereinigten CLL-Tumorzellproben wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest retrospektiv analysiert. Die zugrunde liegenden Signalintensitäten der Hybridisierung waren mit der MAS-Software erfasst worden. Kriterium für differentiell exprimierte Gene: $p \leq 0,05$. Dargestellt sind sechs DNA-Reparaturgene, die diesem Filterkriterium entsprachen.

Von den etwa 7100 Probesets des HuGeneFL Chips wiesen unter den gewählten Bedingungen 113 Probesets signifikante Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen auf, von denen 85 in der resistenten Gruppe höher exprimiert wurden. Unter den genannten, relativ stringenten Filterregeln für differentiell

exprimierte Gene fanden sich keine echten DNA-Reparaturgene, während bei einer erweiterten Betrachtung des gesamten „DNA damage response“-Netzwerks nur drei nicht unmittelbar mit DNA-Reparatur assoziierte Gene (*stat1*, *dusp1*, *terf2*) als differentiell exprimiert identifiziert werden konnten. Daher wurden die Filterregeln gelockert, so dass allein ein p-Wert von mindestens 0,05 als Signifikanzgrenze im Wilcoxon-Test gefordert wurde. Auf diese Weise wurden sechs Reparaturgene als differentiell exprimiert identifiziert (Abb. 9).

Fünf der sechs unter diesen Filterbedingungen als differentiell exprimiert gefundenen Gene (*ercc6*, *gtfllh1*, *gtfllh4*, *rpa3*, *xpa*) sind an der Bildung eines Multi-Enzymkomplexes beteiligt. Diese so genannte Exzisionsnuklease spielt eine zentrale Rolle während der Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Die differentielle Expression von *ercc6* (*csb*), einem spezifischen Faktor für die Transkriptions-gekoppelte Reparatur (s. Abb. 1), könnte sogar einen Hinweis auf die differentielle Aktivität dieses speziellen NER-Weges in resistenten CLL-Lymphozyten liefern. Die Aktivität der TCR ist in ruhenden, nicht replizierenden Zellen deshalb besonders wichtig, weil für diese Zellen in erster Linie der Erhalt der genetischen Information in aktiven und damit für den Zellmetabolismus wichtigen Genen im Vordergrund steht. Eine erhöhte Expression von wichtigen Komponenten dieses Reparatursystems könnte somit durch die geringere DNA-Adduktbelastung in aktiven Genen nach einer DNA reaktiven Chemotherapie einen Überlebensvorteil von resistenten CLL-Tumorzellen vermitteln.

3.3.2.2 RNA-Expressionsanalyse von gereinigten CD19⁺ CLL B-Lymphozyten

Wie sich im Lauf der Arbeit herausstellte, war der Anteil an malignen B-Lymphozyten im Blut der CLL-Patienten in den verschiedenen Stadien der Erkrankung bzw. nach erfolgreicher Chemotherapie unterschiedlich hoch. Außerdem zeigte sich, dass bereits eine relativ geringe Verunreinigung mit anderen Zellen großen Einfluss auf das jeweilige RNA-Expressionsprofil hatte. Deshalb wurden aus den vorgereinigten peripheren mononukleären Zellen CD19⁺ B-Lymphozyten über Magnetsäulen isoliert (Reinheit > 95 %). Die gewählte Patienten-Gruppe bestand dabei aus 24 Spendern, von denen dreizehn unbehandelt bzw. Chlorambucil-sensitiv und elf entweder gegen Chlorambucil allein oder gegen Chlorambucil und Fludarabin resistent waren.

Nach RNA-Isolierung und reverser Transkription wurde die biotinylierte cRNA auf Affymetrix HG-U133A Microarrays hybridisiert. Dieser weiter entwickelte Chiptyp enthielt im Gegensatz zu den HuGeneFL Microarrays etwa 22200 Probesets, die ca. 14000 humane Gene repräsentierten; darunter befanden sich alle derzeit bekannten „DNA damage response“-Gene. Die aus der Hybridisierung resultierenden Expressionswerte wurden sowohl „unsupervised“ als auch „supervised“, d.h. einmal ohne und einmal mit Vorgabe der Patienten-Gruppen, analysiert.

Für die „unsupervised“-Analyse wurden die Hybridisierungs-Signale an den Probesets mit der MAS-Software aufgenommen und normalisiert. Anschließend wurden die Signale aller Probesets jeweils auf ihre mittlere Fluoreszenzintensität über alle Arrays normiert und logarithmiert. Um uninformative Signale auszuschließen, wurden nur die Probesets der hierarchischen Clusteranalyse (*Spotfire Decision Site for Functional Genomics*) mit Korrelation als Ähnlichkeitsmaß unterzogen, die von der Affymetrix-Software in mindestens 30 % aller Tumorzellproben als „present“ gefunden worden waren (Abb. 10).

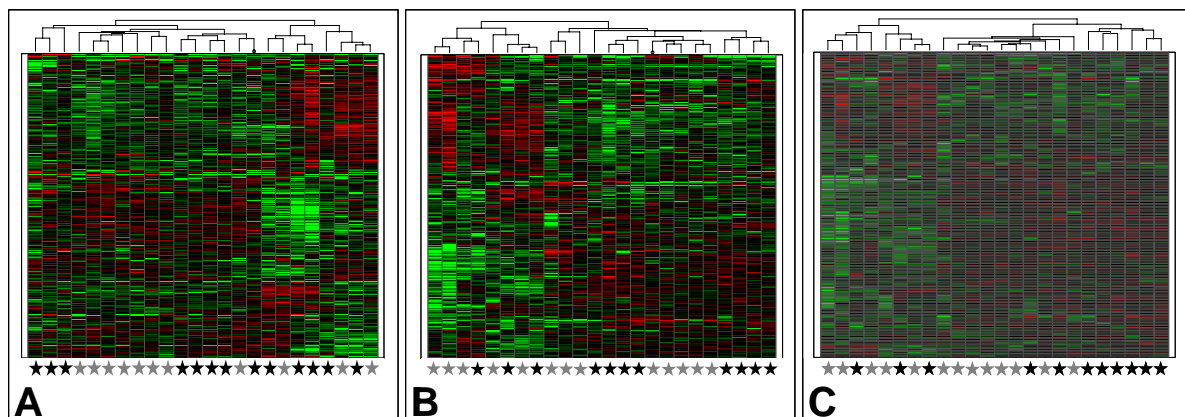


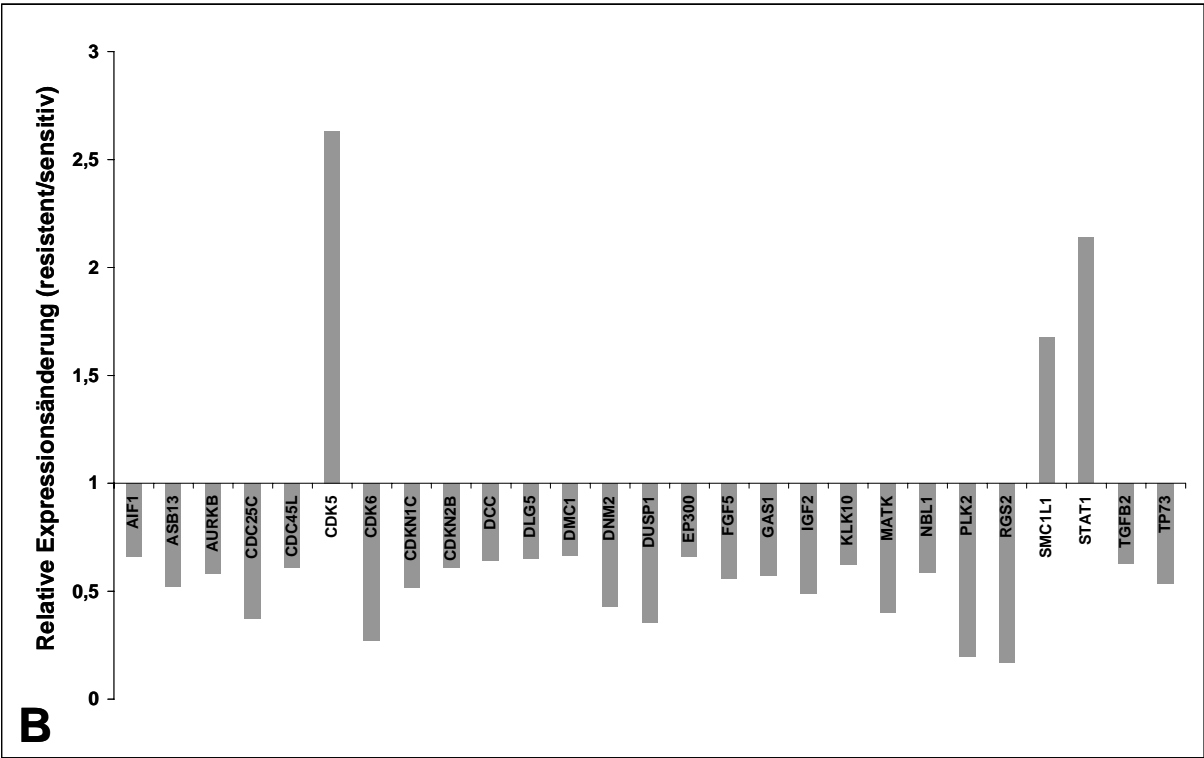
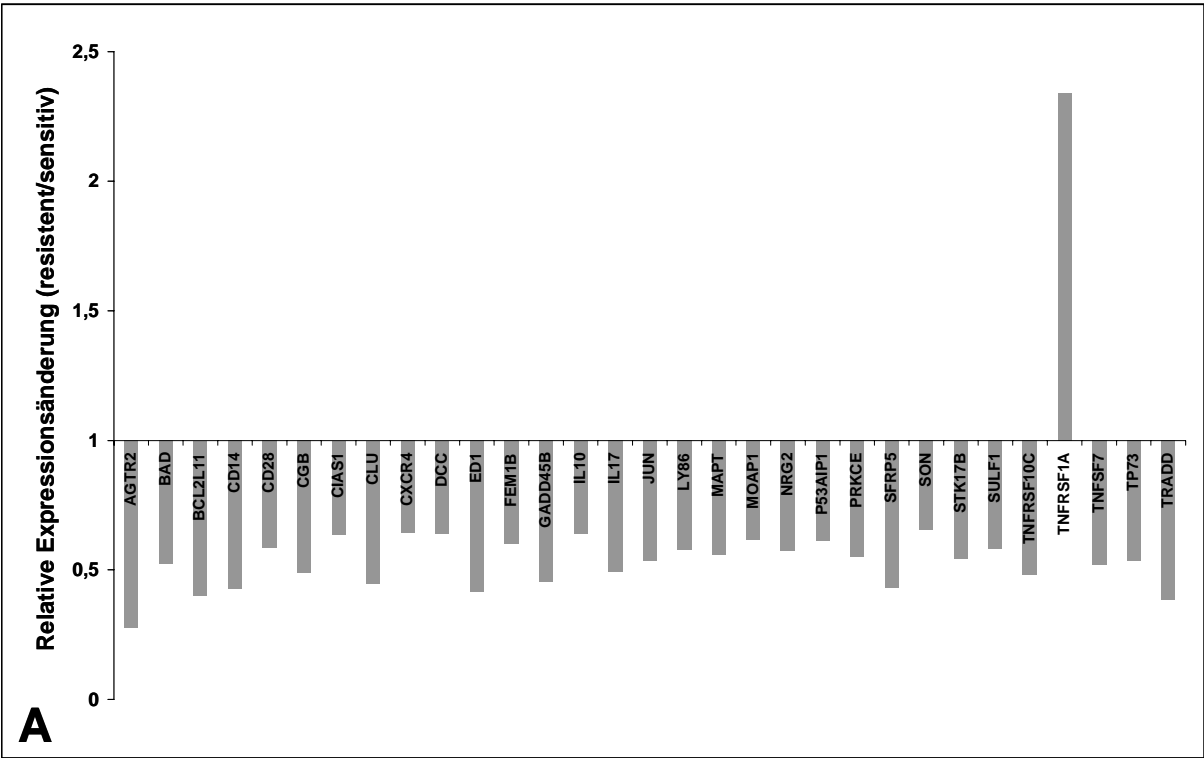
Abb. 10: Hierarchische Clusteranalyse von 24 CD19⁺ CLL-Tumorzellproben. Die Expressionssignale der Probesets wurden auf ihre mittlere Signalintensität normiert und logarithmiert. Probesets mit mehr als 30 % „present calls“ in allen Proben wurden einer „unsupervised“ Clusteranalyse unterzogen. Die relative Expressionshöhe gegenüber dem Mittelwert wird durch grüne (bis zu -4fach) bzw. rote Farbe (bis zu +4fach) ausgedrückt. **A)** Gesamter Array (11275 Probesets); **B)** „DNA damage response“ (878 Probesets); **C)** DNA-Reparatur (186 Probesets). ★ sensitiv, ★ resistent.

Dabei stellte sich heraus, dass die subtilen Unterschiede in der mRNA-Expression nicht ausreichen, um die beiden anhand ihrer Reaktion auf Chemotherapie definierten Gruppen zu trennen. Dies galt sowohl für eine hierarchische Clusteranalyse über alle Probesets des gesamten Arrays (Abb. 10A) als auch für ausgewählte Untergruppen von Probesets. So brachte auch ein Clustering über 878

„DNA damage response“-Probesets (Abb. 10B) bzw. über 186 DNA-Reparaturprobesets (Abb. 10C), die jeweils das „present call“-Kriterium erfüllten, keine Trennung der beiden Patienten-Gruppen anhand von Expressionsunterschieden in DNA-Reparaturgenen, die für die funktionellen Unterschiede verantwortlich sein könnten.

Alternativ wurden die vom Array gelieferten Signalintensitäten mit der *RMAexpress* Software erfasst, normalisiert und die Expressionswerte nach der „Robust Multichip Average“-Methode (RMA, s. 2.2.8) analysiert. Die statistische „supervised“-Analyse erfolgte mit dem SAM-Test (Tusher et al., 2001) unter Vorgabe der beiden CLL-Patientengruppen. Als differentiell exprimiert wurden dabei Probesets angesehen, die im SAM-Test eine „false discovery rate“ (FDR, q) von höchstens 25 % sowie eine relative Expressionsänderung der beiden Gruppen-Mittelwerte von mindestens 1,5 erreichten. Diesen Kriterien entsprachen insgesamt 1226 Probesets (davon 66 in den resistenten Proben hoch reguliert) bzw. 1040 Gene. Diese differentiell exprimierten Gene zeigten in einer „Gene Ontology“ (GO)-Analyse (*GOstat*, <http://gostat.wehi.edu.au>) keine signifikante Anreicherung z.B. in bestimmten biologischen Prozessen oder Funktionen verglichen mit allen Genen des gesamten Chips.

Andererseits sind 60 dieser Gene per Definition an der „DNA damage response“ beteiligt (Abb. 11). Im Gegensatz zu der angedeuteten differentiellen Expression von Komponenten der Transkriptions-gekoppelten Reparatur in der retrospektiven Analyse von mononukleären CLL-Zellen findet man diese in hoch angereicherten CD19⁺ B-Lymphozyten jedoch als nicht differentiell exprimiert. Außerdem wurden keine weiteren Gene identifiziert, die einem oder mehreren klar definierten DNA-Reparaturwegen angehören und so die funktionellen DNA-Reparaturunterschiede erklären könnten.



(Abb. 11; Fortsetzung nächste Seite)

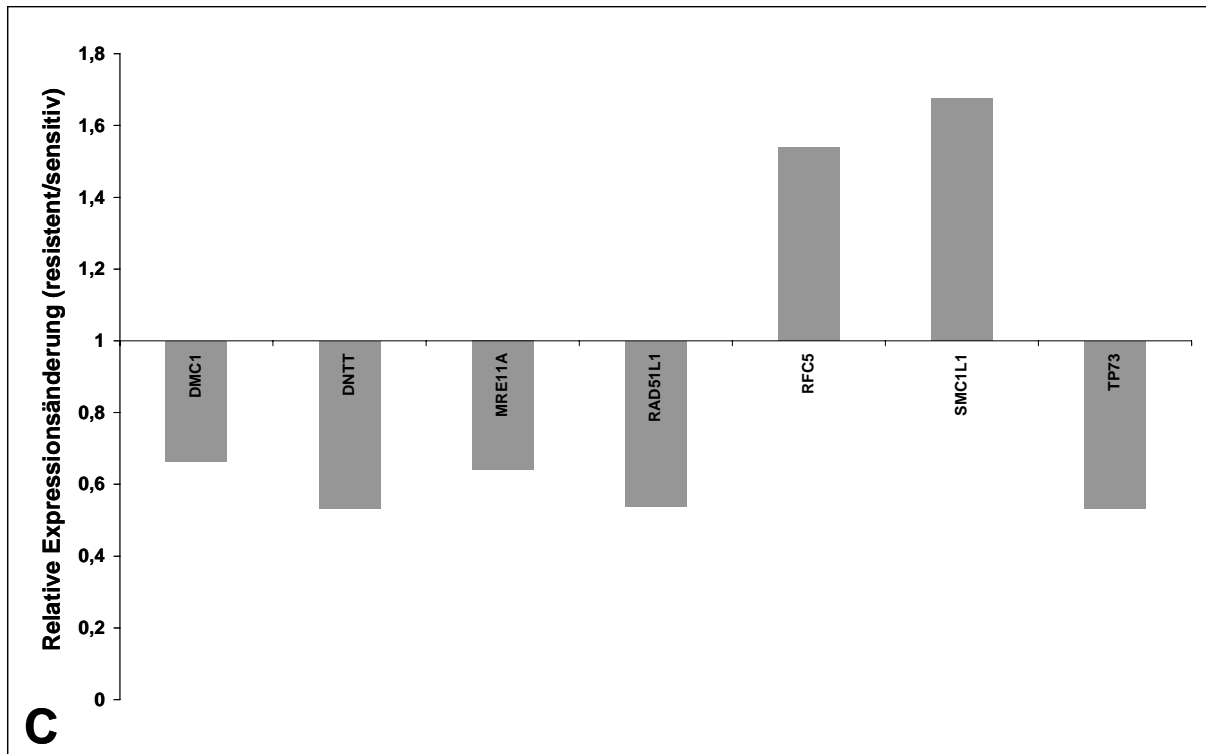


Abb. 11: „Supervised“ RNA-Expressionsanalyse von 24 CD19⁺ CLL-Tumorzellproben. Die cDNA von dreizehn sensitiven bzw. elf resistenten CD19⁺ CLL-Tumorzellproben wurde auf Affymetrix HG-U133A-Microarrays hybridisiert, die Signalintensitäten mit der *RNAexpress*-Software erfasst und mit dem SAM-Test statistisch ausgewertet. Kriterium für differentiell exprimierte Gene: FDR $q < 25\%$, relative Expressionsänderung $\leq 0,67$ bzw. $\geq 1,5$. Dargestellt sind „DNA damage response“-Gene, die diesem Filterkriterien entsprachen. **A)** Apoptose-assoziierte Gene; **B)** Zell-Zyklus-assoziierte Gene; **C)** DNA-Reparatur-assoziierte Gene

3.3.3 Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Lymphozyten im Hinblick auf die DNA-Reparaturkapazität

Die Chemotherapie-Resistenz ging in den meisten der untersuchten CLL-Fälle mit einer erhöhten funktionellen DNA-Reparaturleistung einher (s. Abb. 4). Andererseits sollten auch die beobachteten individuellen Unterschiede in der Reparaturkapazität einzelner durch ihre Chemosensitivität charakterisierte Tumorzellproben berücksichtigt werden. Um den funktionellen Reparaturphänotyp auf eine eventuell differentielle Expression von DNA-Reparaturgenen zurückführen zu können, wurden zwei Gruppen von CLL-Patienten mit bekannter DNA-Reparaturkapazität (s. 3.2.1) unabhängig von ihrer Chemosensitivität definiert.

Dazu wurde der Mittelwert der im Comet Assay ermittelten Reparaturgeschwindigkeiten (Reduktion OTM/min) von elf CLL-Patienten als Trennlinie zur Bildung einer „langsamen“ und einer „schnellen“ Gruppe benutzt (Abb. 12).

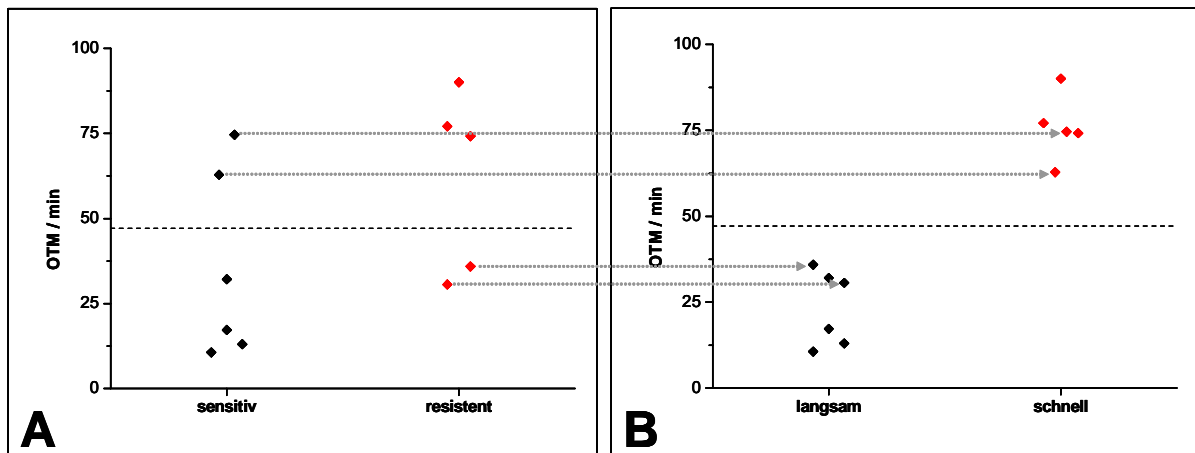


Abb. 12: Aufteilung von elf CD19⁺ CLL-Tumorzellproben anhand ihrer DNA-Reparaturleistung. **A)** DNA-Reparaturleistung (OTM/min) in sechs sensitiven und fünf resistenten CLL-Proben vor der Neugruppierung. **B)** Neubildung zweier Gruppen mit „langsam“ bzw. „schnell“ reparierenden Tumorzellproben durch Austausch von je zwei Proben. Gestrichelte Linie: Mittelwert der elf Reparaturgeschwindigkeiten.

Mit diesen beiden Gruppen von CLL-Patienten bekannter DNA-Reparaturleistung wurden ebenfalls sowohl eine „unsupervised“- als auch eine „supervised“-Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei brachte die „unsupervised“-Clusteranalyse der mit MAS ausgewerteten und wiederum in 30 % der Proben als „present“ bewerteten Probesets (s. 3.3.2.2) keine Trennung von CLL-Patienten mit langsamer bzw. schneller funktioneller DNA-Reparatur (Abb. 13).

Auch die „supervised“-Analyse der mit *RMAexpress* berechneten Signalintensitäten ergab im SAM-Test keine differentiell exprimierten DNA-Reparatur- bzw. sonstigen Gene mit einer FDR $q < 43$ %.

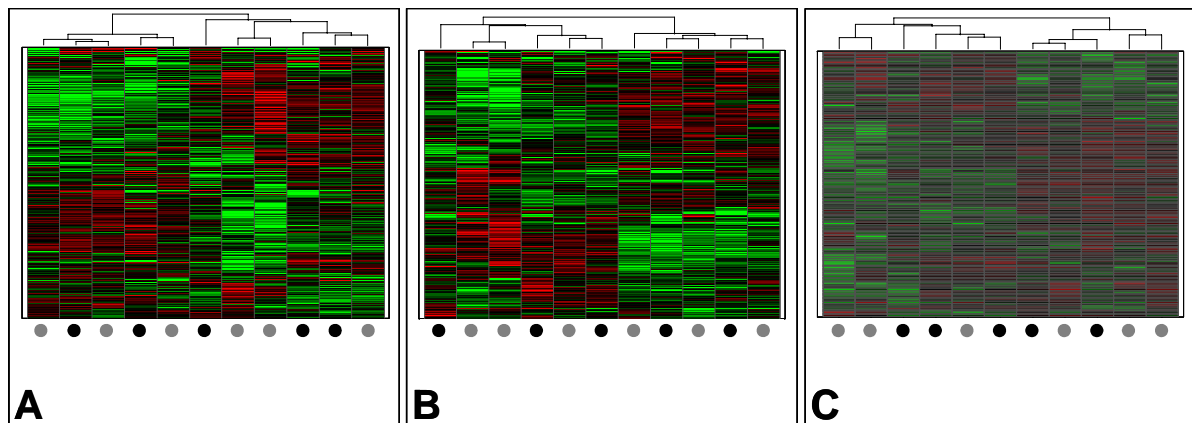


Abb. 13: Hierarchische Clusteranalyse von elf CD19⁺ CLL-Tumorzellproben. Die Expressionssignale der Probesets wurden auf ihre mittlere Signalintensität normiert und logarithmiert. Probesets mit mehr als 30 % „present calls“ in allen Proben wurden einer „unsupervised“-Clusteranalyse unterzogen. Die relative Expressionshöhe gegenüber dem Mittelwert wird durch grüne (bis zu -2,5fach) bzw. rote Farbe (bis zu +2,5fach) ausgedrückt. **A)** Gesamter Array (11175 Probesets); **B)** „DNA damage response“ (860 Probesets); **C)** DNA-Reparatur (181 Probesets). ● langsamer Reparaturphänotyp, ● schneller Reparaturphänotyp.

Ein Grund für die Schwierigkeit bei der Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in den vorausgegangenen Analysen könnte sein, dass die unterschiedliche funktionelle Reparaturantwort nach Induktion einer ganzen Reihe von verschiedenen DNA-Addukten durch ENU nicht auf einer veränderten Expression von Genen des „DNA damage response“-Netzwerks beruht, sondern vielmehr durch postranskriptionelle Mechanismen reguliert wird. Eine alternative Begründung wäre die hohe interindividuelle Varianz der Expressionshöhen einzelner dieser Gene, die bei Gruppenanalysen, die auf einem Mittelwertsvergleich beruhen, zu einer Maskierung von eventuell differentiell exprimierten Genen in individuellen Tumorzellproben führen könnte.

Deshalb wurden die Expressionsdaten der DNA-Reparaturgene individueller CD19⁺ Tumorzellproben mit bekannter funktioneller Reparaturreaktion auf ENU induzierte DNA-Schädigung auf auffällige Änderungen untersucht. Dazu wurden die Expressionswerte von 260 DNA-Reparaturprobesets (156 Reparaturgene) jeweils eines Patienten mit „schneller“ Reparaturkinetik mit denen eines Patienten mit „langsamer“ Kinetik verglichen. Als Maß für die Ähnlichkeit der Expression aller DNA-Reparaturprobesets wurde die Pearson'sche Rangkorrelation verwendet.

Dabei stellte sich heraus, dass die Korrelation der Expression von DNA-Reparaturgenen zwischen den beiden in ihrer Reparaturkinetik unterscheidbaren CLL-Patienten mit 0,77 (Abb. 14A) erwartungsgemäß niedriger war als die

Korrelation von 260 zufällig ausgewählten Probesets ($r=0,96$). Dieser Befund könnte auf eine Verschiebung im Expressionsprofil der Reparaturgene hindeuten. Verglich man allerdings die entsprechenden Expressionswerte beispielsweise zweier Patienten mit gleicher (langsamer) Reparaturreaktion auf ENU induzierte DNA-Schädigung, erhielt man wiederum eine niedrige Korrelation von 0,75 verglichen mit 0,98 für zufällig ausgewählte Probesets (Abb. 14B).

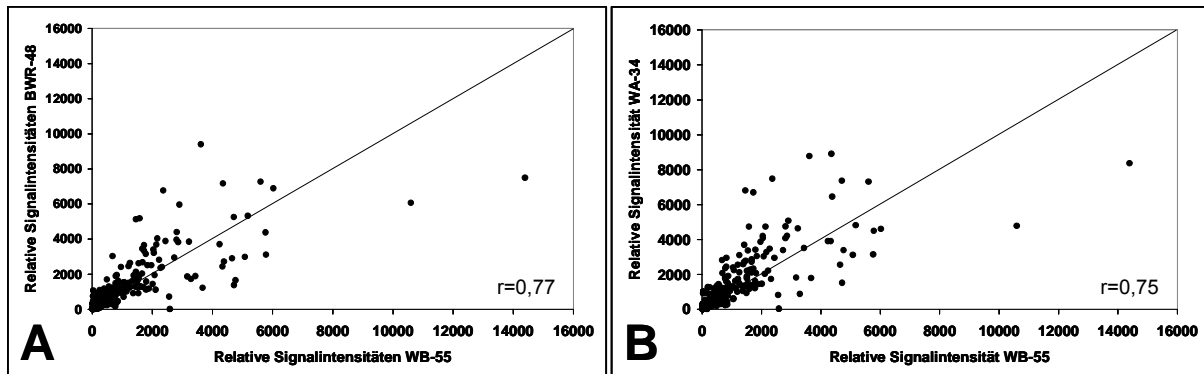


Abb. 14: Korrelation der Expression von DNA Reparaturgenen zwischen individuellen CLL-Tumorzellproben. Korrelation der Expression (relative Signalintensität) von 260 DNA-Reparaturprobesets zwischen **A)** der Tumorzellprobe eines CLL-Patienten mit niedriger (11 OTM/min, WB-55) und der Probe eines Patienten mit hoher (90 OTM/min, BWR-48) funktioneller DNA-Reparaturaktivität nach ENU-Exposition und **B)** den Proben zweier Patienten mit niedriger DNA-Reparaturaktivität (11 OTM/min, WB-55; 13 OTM/min, WA-34). Gene werden z.T. durch mehr als ein Probeset repräsentiert. r = Pearson'scher Rangkorrelations-Koeffizient.

Diese Beobachtung betonte ein weiteres Mal die großen interindividuellen Unterschiede in der Expression von DNA-Reparaturgenen. Daher war es denkbar, dass die Unterschiede der „globalen“ funktionellen DNA-Reparaturgeschwindigkeiten, die die Summe der Aktivität mehrerer distinkter DNA-Reparaturwege darstellte, auf einer sehr individuell regulierten Expression einzelner DNA-Reparaturwege beruht. Diese Hypothese wurde durch die in Abschnitt 3.2.2 sowie in früheren Arbeiten mit mononukleären CLL-Proben gezeigten individuellen funktionellen Beteiligungen verschiedener Reparaturwege an der Gesamt-Reparaturantwort auf DNA-Schädigung nach ENU-Exposition unterstützt.

Daher wurde nun die DNA-Reparaturgen-Expression von Tumorzellproben mit bekannter, unterschiedlicher Nutzung distinkter DNA-Reparaturwege zur Beseitigung von ENU induzierten DNA-Schäden vergleichend untersucht. Dabei konnte beispielsweise für eine CLL-Probe mit einem relativ hohen Anteil der Basen-Exzisions-Reparatur im Vergleich zu einer Probe mit entsprechend geringerer

Beteiligung dieses Reparaturmechanismus eine leicht reduzierte Korrelation (Abb. 15A) in der Expression von 25 wichtigen BER-Probesets (18 Genen) gegenüber zwei Proben mit gleichartig hoher Beteiligung der BER gezeigt werden (Abb. 15B). Dieser Zusammenhang konnte jedoch für 29 Probesets (24 Gene) der Nukleotid-Exzisions-Reparatur nicht bestätigt werden, da hier die Korrelation zwischen der Genexpression zweier Zellproben mit annähernd gleichem funktionellem NER-Anteil geringer ausfiel als die Korrelation zwischen zwei Proben mit stark unterschiedlicher NER-Beteiligung (Abb. 15C,D).

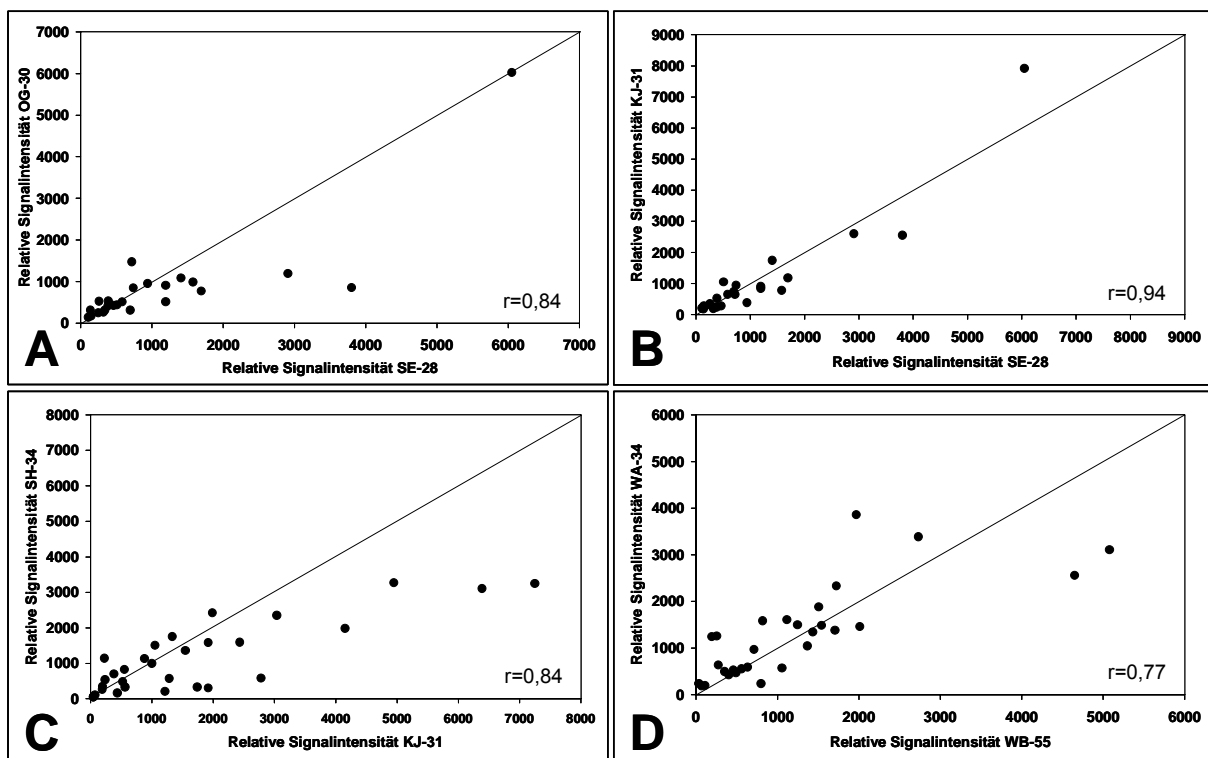


Abb. 15: Korrelation der Expression von Genen distinkter DNA-Reparaturwege zwischen individuellen CLL-Tumorzellproben. Korrelation der Expression (relative Signalintensität) von 25 BER-Probesets zwischen **A)** der Tumorzellprobe eines CLL-Patienten mit hoher (36 %, SE-28) und der Probe eines Patienten mit niedriger (15 %, OG-30) funktioneller Beteiligung der BER an der Gesamt-Reparaturleistung nach ENU-Exposition und **B)** den Proben zweier Patienten mit ähnlichem BER-Anteil (36 %, SE-28; 32 %, KJ-31). Korrelation der Expression von 29 NER-Probesets zwischen **C)** der Probe eines CLL-Patienten mit hoher (188%, KJ-31) und der Probe eines Patienten mit niedriger (42 %, SH-34) relativer NER-Aktivität (s. Abb. 5) nach ENU-Exposition und **D)** den Proben zweier Patienten mit ähnlicher relativer NER-Aktivität (89 %, WA-34; 98 %, WB-55). Gene werden z.T. durch mehr als ein Probeset repräsentiert. r = Pearson'scher Rangkorrelations-Koeffizient.

Bei der detaillierteren Analyse der Expression einzelner, bestimmten DNA-Reparaturwegen zugehöriger Gene von individuellen Patienten stellten sich jedoch durchaus Unterschiede heraus. So wurde beispielsweise beim direkten Vergleich der Expression von BER-Genen in einem CLL-Patienten mit hohem funktionellen BER-

Anteil an der Gesamt-Reparaturleistung nach ENU-Exposition und einem Patienten mit relativ niedriger BER-Beteiligung eine differentielle Expression des Gens *rfc5* festgestellt. Dies galt auch gegenüber dem Mittelwert der Expression bei allen 24 analysierten CLL-Tumorzellproben (Abb. 16A). Bei einem direkten Vergleich zwischen zwei Patienten, die den BER-Weg in einem vergleichbaren (hohen) Maß benutzen, fand sich entsprechend eine konsistent höhere Expression von *rfc5* in beiden Proben gegenüber dem Mittelwert (Abb. 16B). Ähnliches wurde auch für eines von zwei Probesets der Thymin-DNA Glykosylase TDG beobachtet.

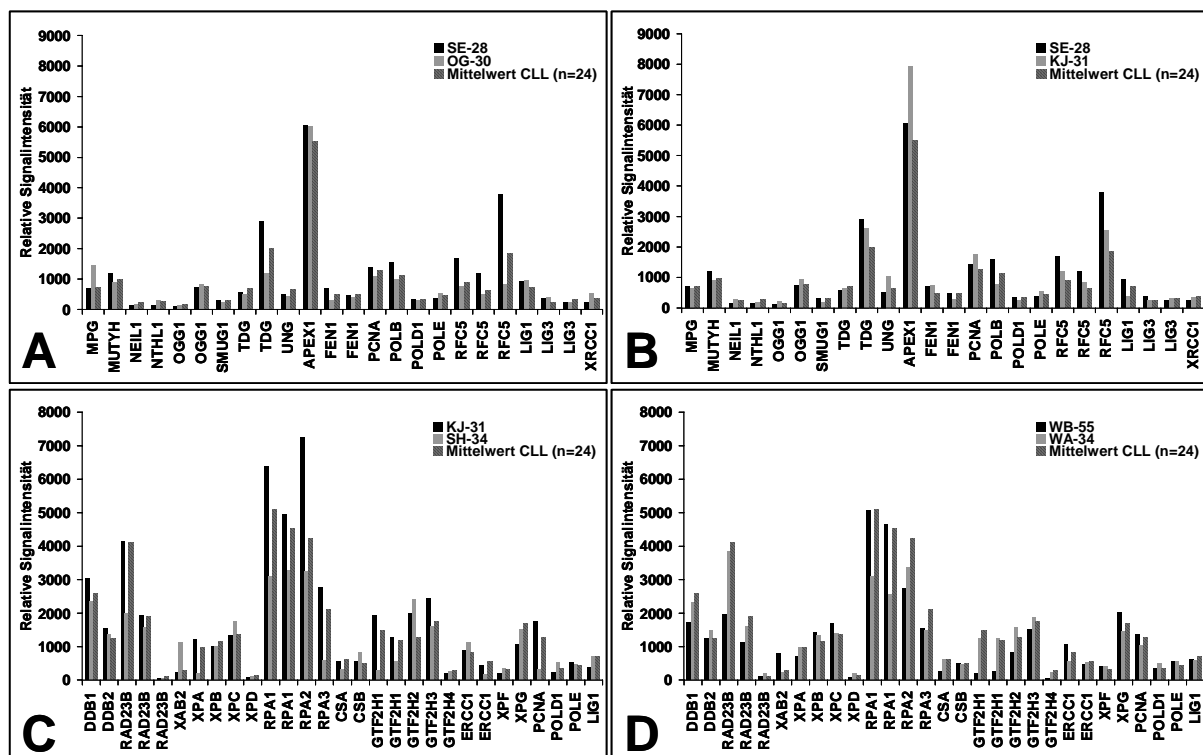


Abb. 16: Expression von Genen distinkter DNA-Reparaturwege in individuellen CLL-Tumorzellproben. Expression (relative Signalintensität) von 25 BER-Probesets in **A**) der Tumorzellprobe eines CLL-Patienten mit hoher (36 %, SE-28) und der Probe eines Patienten mit niedriger (15 %, OG-30) funktioneller Beteiligung der BER an der Gesamt-Reparaturleistung nach ENU-Exposition und **B**) den Proben zweier Patienten mit ähnlichem BER-Anteil (36 %, SE-28; 32 %, KJ-31). Expression von 29 NER-Probesets in **C**) der Probe eines CLL-Patienten mit hoher (188%, KJ-31) und der Probe eines Patienten mit niedriger (42 %, SH-34) relativer NER-Aktivität nach ENU-Exposition und **D**) den Proben zweier Patienten mit ähnlicher relativer NER-Aktivität (89 %, WA-34; 98 %, WB-55).

Bemerkenswert ist, dass *rfc5* eines der wenigen zwischen Therapie sensiblen und Therapie resistenten CD19⁺ CLL-Tumorzellproben differentiell exprimierten DNA-Reparaturgene ist (s. 3.3.2.2). Dies könnte ein erster Hinweis für die Bedeutung von distinkten DNA-Reparaturprozessen in der Therapie-Resistenz sein, da die

Zellproben, die eine höhere *rfc5*-Expression bzw. eine relativ höhere BER-Beteiligung an der DNA-Reparatur zeigten, auch gleichzeitig Therapie resistent waren.

Noch deutlicher wurde der Nutzen von individuellen Expressionsvergleichen, wenn man den Nukleotid-Exzisions-Reparaturweg auf der Ebene von einzelnen Genen analysierte. Vergleich man beispielsweise die NER-Genexpression zweier CLL-Tumorzellproben, die zwar beide eine „langsame“ globale DNA-Reparatur aufwiesen, sich aber in der Beteiligung des NER-Weges deutlich unterschieden, so wurden mehrere NER-Gene auffällig unterschiedlich exprimiert (Abb. 16C). Diese differentielle Expression konnte bei einem Vergleich zweier Tumorzellproben mit vergleichbar niedriger NER-Beteiligung nicht beobachtet werden (Abb. 16D). Hier lagen die Expressionshöhen der betreffenden Gene auf dem Niveau des Mittelwertes aller 24 CLL-Proben oder sogar darunter.

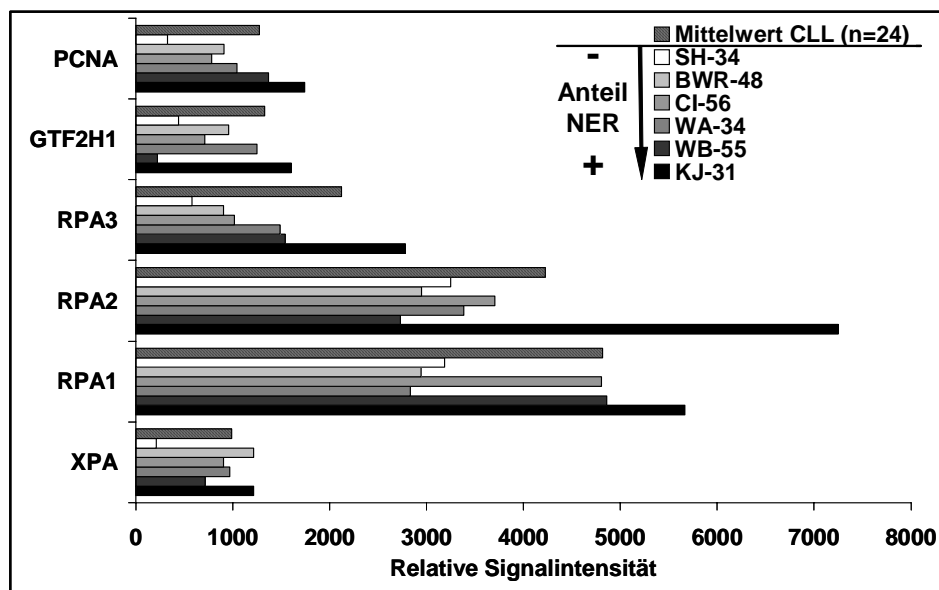


Abb. 17: RNA-Expressionsniveaus von ausgewählten NER-Genen und deren mögliche Bedeutung für den individuellen funktionellen Reparaturphänotyp. Die RNA-Expression von sechs NER-Genen wurde in sechs individuellen, durch unterschiedliche funktionelle Nutzung des NER-Reparaturweges charakterisierten CLL-Tumorzellproben untersucht. Die NER-Beteiligung an der Gesamt-Reparaturleistung nimmt dabei in der gewählten Darstellung in den individuellen Proben von oben nach unten zu (s. Legende; □ geringe NER-Beteiligung; ■ hohe NER-Beteiligung)

Vier der sechs mit einer hohen funktionellen NER-Aktivität korrelierten Gene (Abb. 17) waren auch bereits in der retrospektiven Analyse der mononukleären CLL-Zellen in Bezug auf die Chemosensitivität als differentiell exprimiert identifiziert worden. Dass diese Gene allerdings nur unter sehr permissiv gehaltenen Filterregeln auffällig

wurden, unterstreicht weiterhin die hohe Relevanz von Genexpressionsanalysen auf der Ebene von individuellen Einzelproben. Statistische Auswertungen auf der Basis von Gruppenmittelwerten erscheinen demgegenüber zur Identifikation von DNA-Reparaturgenen, deren Expressionseigenschaften mit den funktionellen Beobachtungen korrelieren, eher ungeeignet. Auch für die Expression dieser sechs NER-Gene wurde der Trend beobachtet, dass sowohl die relativ niedrigere Genexpression auf individueller Ebene als auch der funktionelle NER-Phänotyp in vier von sechs untersuchten Fällen mit der Chemosensitivität einhergeht. Eine der Therapie resistenten Tumorzellproben verhielt sich sowohl bezüglich ihrer NER-Beteiligung als auch ihr NER-Expressionsprofil betreffend wie eine Probe der sensitiven Gruppe (BWR-48; Abb. 17). Im Gegensatz dazu stammte die Tumorzellprobe mit der höchsten Expression dieser sechs Gene sowie dem höchsten funktionellen NER-Anteil an der Gesamt-Reparaturleistung von einem Therapie resistenten CLL-Patienten (KJ-31; Abb. 17).

3.4 Funktionelle Untersuchung der DNA reaktiven Wirkung von Chlorambucil

Trotz des langjährigen erfolgreichen Einsatzes von Chlorambucil bei der Behandlung der CLL sind die molekularen Grundlagen für diesen Erfolg weitgehend unbekannt. Aufgrund seiner DNA-Reaktivität werden verschiedene DNA-Läsionen, die zu DNA-Strangbrüchen führen und über verschiedene DNA-Reparaturwege repariert werden können, mit der zytotoxischen Wirkung von CLB in Verbindung gebracht. Ebenso wird der Einfluss von verschiedenen DNA-Reparatursystemen auf die Entwicklung einer CLB-Resistenz diskutiert. Daher sollte im folgenden Teil der Arbeit die Bildung von DNA-Strangbrüchen und die Einleitung der Apoptose nach Chlorambucil-Behandlung von primären humanen Lymphozyten untersucht werden. Außerdem sollten durch gezielten Einsatz von spezifischen DNA-Reparaturmodulatoren Rückschlüsse auf die gebildeten Addukte bzw. die an der Reparatur der CLB induzierten DNA-Modifikationen beteiligten Reparaturwege gezogen werden.

Zur Etablierung der dazu eingesetzten Methoden wurden für die nachfolgenden Untersuchungen normale Lymphozyten verwendet. Dadurch sollten störende

Einflüsse durch Tumorzell-spezifische Eigenschaften und die in den zuvor beschriebenen Experimenten beobachteten hohen individuellen Unterschiede zwischen unterschiedlichen CLL-Proben ausgeschlossen werden.

3.4.1 Nachweis von DNA-Strangbrüchen nach Chlorambucil-Behandlung

Grundsätzlich können durch die Reaktion der funktionellen Chloro-Ethylgruppen des Chlorambucils mit nukleophilen Zentren wie z.B. N7-Guanin in der DNA sowohl Monoaddukte als auch Intra- oder Interstrangaddukte auftreten, die in der Folge durch die Inzisionsaktivität verschiedener DNA-Reparaturmechanismen als sekundäre Einzel- oder Doppelstrangbrüche detektierbar sein sollten (Abb. 18).

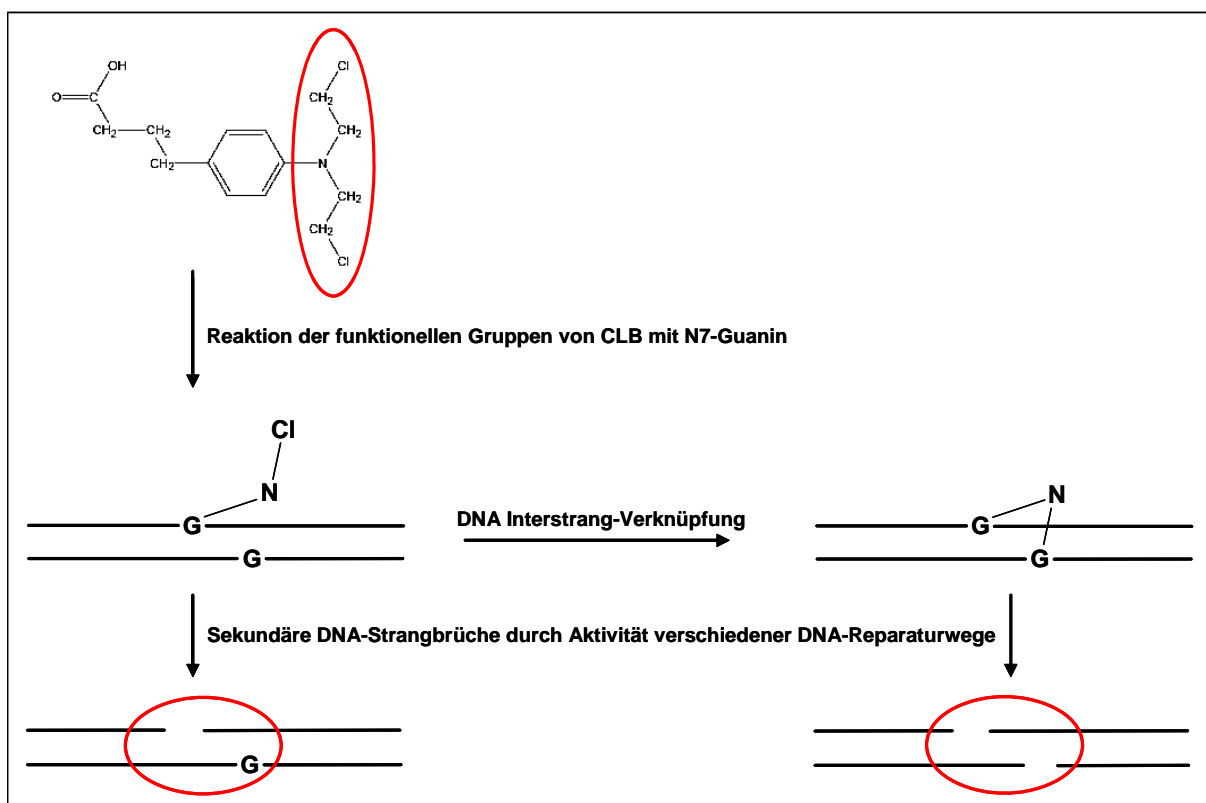


Abb. 18: Mögliche Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Chlorambucil-Behandlung.

Für den Nachweis von möglichen Chlorambucil induzierten DNA-Strangbrüchen wurde der alkalische Comet Assay verwendet. Dazu musste das für die Detektion von ENU induzierten Strangbrüchen bereits etablierte Protokoll angepasst werden. Durch eine Erhöhung der Inkubationsdauer auf 45 Minuten für die alkalische

Denaturierung der DNA konnten so erstmals Strangbrüche nach CLB-Behandlung in primären humanen Lymphozyten nachgewiesen werden (Abb. 19).

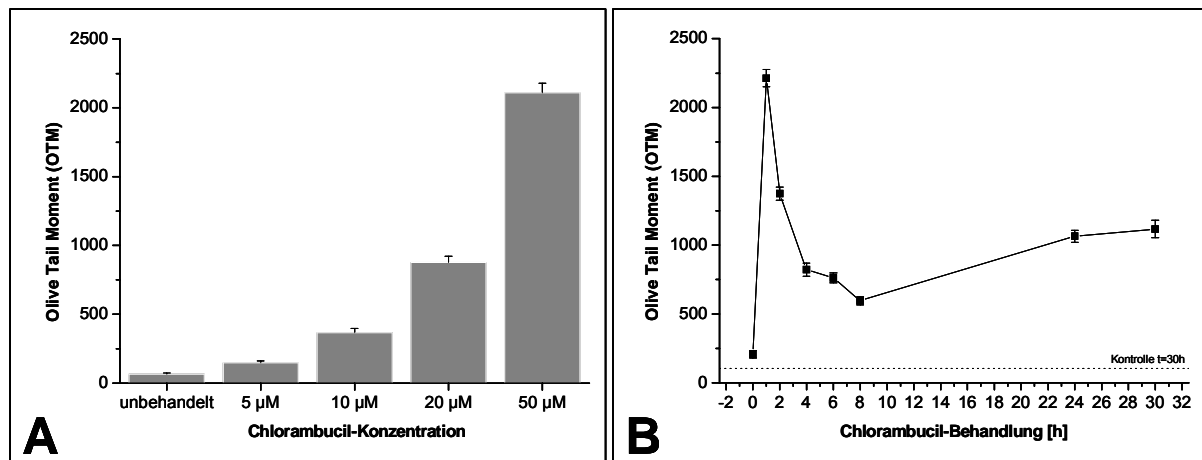


Abb. 19: Detektion von DNA-Strangbrüchen nach Chlorambucil-Behandlung von normalen humanen Lymphozyten. **A)** Ficoll gereinigte Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden *ex vivo* für 2 h mit CLB behandelt und die so induzierten Strangbrüche anschließend im alkalischen Comet Assay nachgewiesen. **B)** Ficoll gereinigte Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden in RPMI1640-Medium mit 50 μ M CLB behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots für die Analyse im Comet Assay entnommen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die spontane Strangbruchrate unbehandelter Zellen nach 30 h. In A) und B) wurden jeweils etwa 150 Zellen pro Messpunkt ausgewertet (Fehlerbalken: SEM).

Dabei zeigte sich im Comet Assay eine lineare Abhängigkeit der DNA-Strangbruchrate von der eingesetzten Chlorambucil-Konzentration (Abb. 19A). Beobachtete man die Entwicklung der Strangbruchraten über die Zeit, so konnte ein deutlicher, schneller Anstieg von Strangbrüchen bereits ein bis maximal zwei Stunden nach Beginn der Behandlung festgestellt werden (Abb. 19B). Diese Strangbrüche wurden innerhalb der folgenden fünf bis sieben Stunden zu ungefähr 75 % wieder verschlossen, während 24 bis 30 Stunden nach Beginn der Behandlung wiederum ein Anstieg der Strangbrüche gemessen werden konnte.

3.4.2 Charakterisierung der durch Chlorambucil-Behandlung induzierten DNA-Strangbrüche

Der alkalische Comet Assay weist aufgrund des Denaturierungsschrittes bei pH 12,7 sowohl DNA-Einzel- als auch Doppelstrangbrüche nach (s. 3.2.1, Abb. 3A). Daher wurde mit dem so genannten γ H2AX-Assay überprüft, ob das im Comet Assay

deutlich zu erkennende Strangbruch-Maximum auf Einzel- oder Doppelstrangbrüche zurückzuführen war.

Die DNA gebundene Histonvariante H2AX wird nach Auftreten eines DNA-Doppelstrangbruches in beide Richtungen vom betreffenden Bruchpunkt aus phosphoryliert (Abb. 20). Über die spezifische Bindung eines monoklonalen Antikörpers gegen die phosphorylierte Form von H2AX (γ H2AX) und anschließende Reaktion von Fluoreszenz gekoppelten Sekundär-Antikörpern (s. 2.2.6) können DNA-Doppelstrangbrüche anhand der so genannten „ γ H2AX-Foci“ im Zellkern detektiert werden.

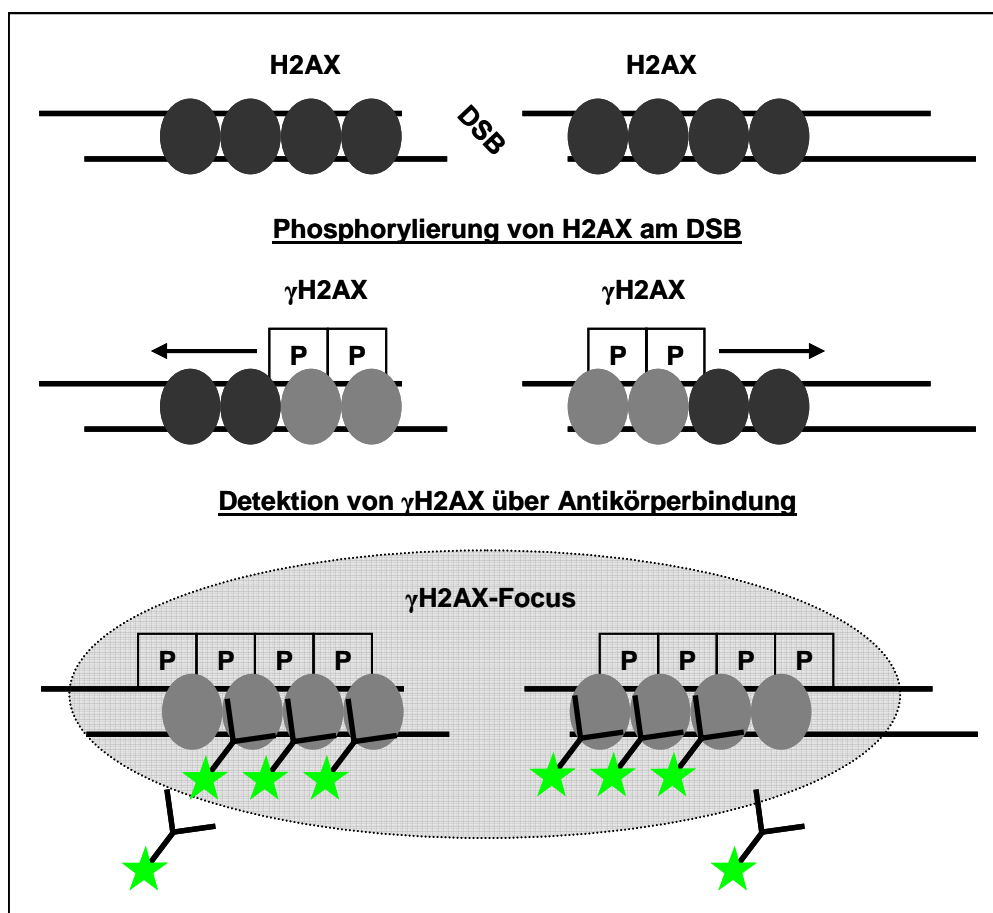


Abb. 20: Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen im „ γ H2AX-Assay“. Die lokale Ballung von phosphorylierten und Antikörper markierten H2AX-Proteinen um den Doppelstrangbruch herum wird als γ H2AX-Focus bezeichnet.

In der Positivkontrolle konnte das Auftreten dieser Foci nach physikalischer Induktion von Doppelstrangbrüchen mit ionisierender Strahlung gezeigt werden. Im Gegensatz dazu waren bei Chlorambucil exponierten Lymphozyten innerhalb der ersten vier Stunden keine γ H2AX-Foci detektierbar. Auch nach einer Erhöhung der CLB-Dosis

auf 100 μM konnten so keine DNA-Doppelstrangbrüche zum Zeitpunkt des im Comet Assay beobachteten OTM-Maximums nachgewiesen werden (Abb. 21).

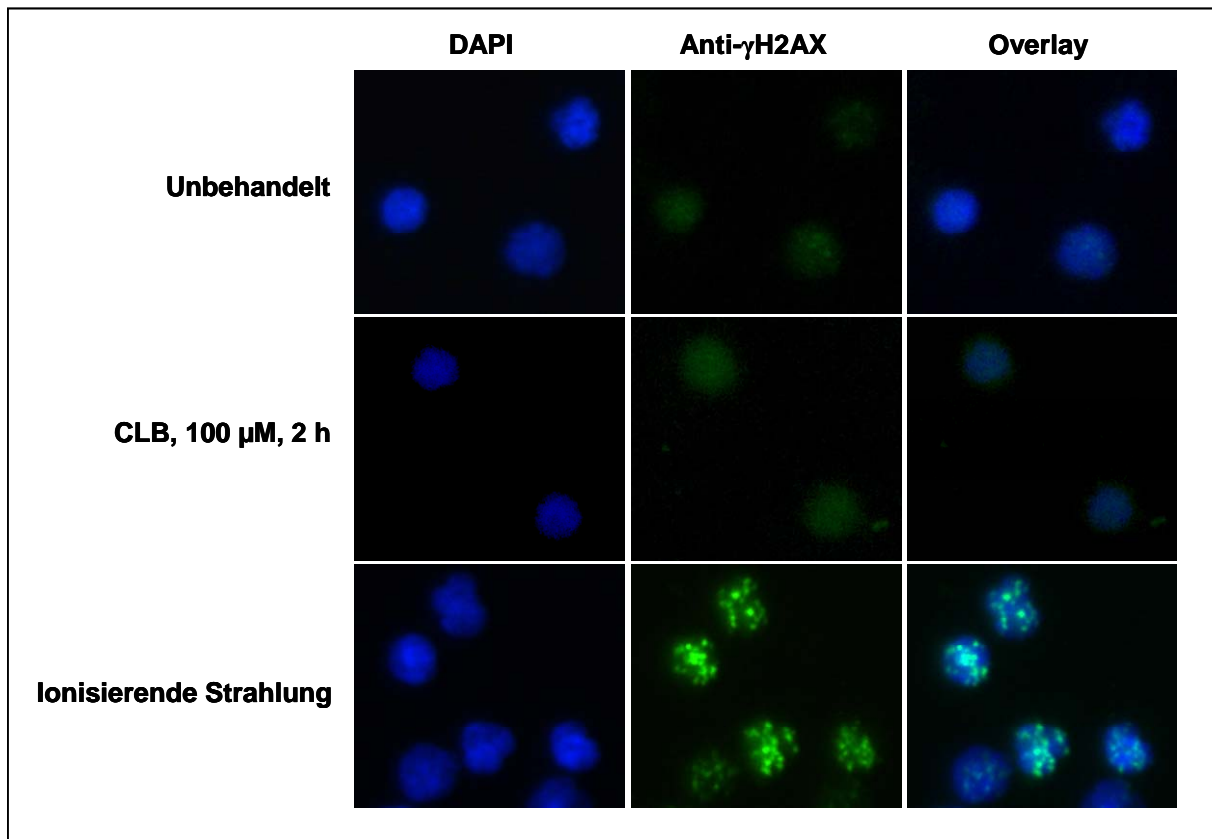


Abb. 21: Keine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in normalen Lymphozyten nach Chlorambucil-Behandlung. Ficoll gereinigte Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden bis zu 4 h mit unterschiedlichen CLB-Konzentrationen behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten Zellaliquots im γH2AX -Assay untersucht. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte in keiner der Zellproben eine Anhäufung von Immunfluoreszenz-Signalen (grün) und damit Hinweise auf DNA-Doppelstrangbrüche gefunden werden (oben/mitte). Nach Bestrahlung von Lymphozyten zeigte sich jedoch eine klare Induktion von Doppelstrangbrüchen: Deutlich sind die so genannten „ γH2AX -Foci“ im Zellkern erkennbar (unten).

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob es sich bei den im Comet Assay nachweisbaren DNA-Läsionen um Reparatur induzierte Einzelstrangbrüche handelt. Dazu wurden isolierte Normal-Lymphozyten vor der CLB-Exposition mit den oben (s. 3.2.2) bereits verwendeten zellgängigen Inhibitoren für bestimmte DNA-Reparaturschritte vorinkubiert.

Die Blockierung des BER-Weges durch Methoxyamin zeigte keinen deutlichen Einfluss auf den Verlauf und das Maximum der Strangbruchbildung nach CLB-Behandlung (Abb. 22). Daher ist eine Beteiligung der Basen-Exzision an der Prozessierung von CLB-Addukten eher unwahrscheinlich.

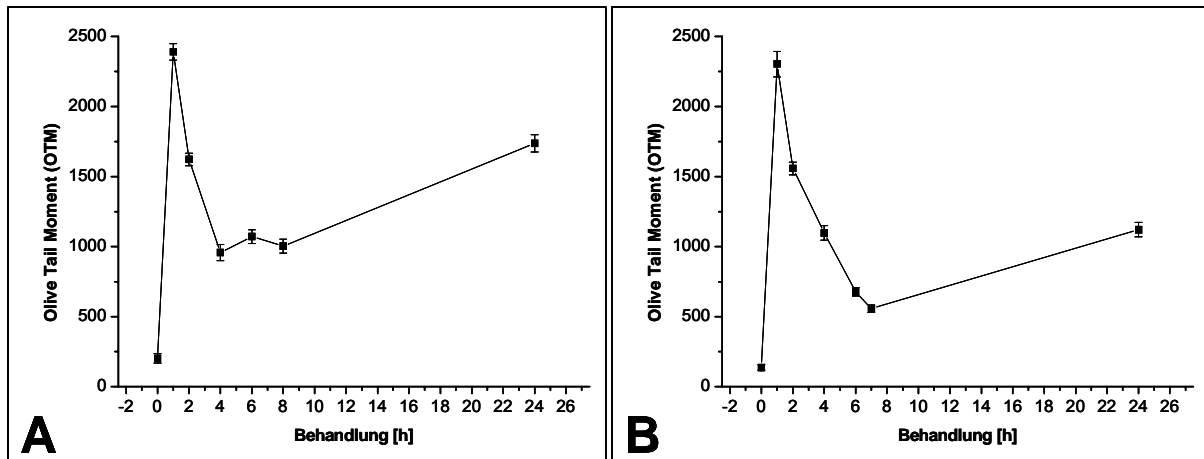


Abb. 22: Der BER-Inhibitor Methoxyamin zeigt keinen Einfluss auf die Bildung von Chlorambucil induzierten DNA-Strangbrüchen. A) DNA-Strangbruchkinetik von Normal-Lymphozyten unter Chlorambucil-Behandlung (50 μ M). **B)** DNA-Strangbruchkinetik von Normal-Lymphozyten unter kombinierter Chlorambucil- und Methoxyamin-Behandlung (5 mM).

Im Gegensatz dazu konnte durch die Modulation der Nukleotid-Exzisions-Reparatur durch Fludarabin ein dramatischer Anstieg der Strangbruchraten im Comet Assay gezeigt werden (Abb. 23).

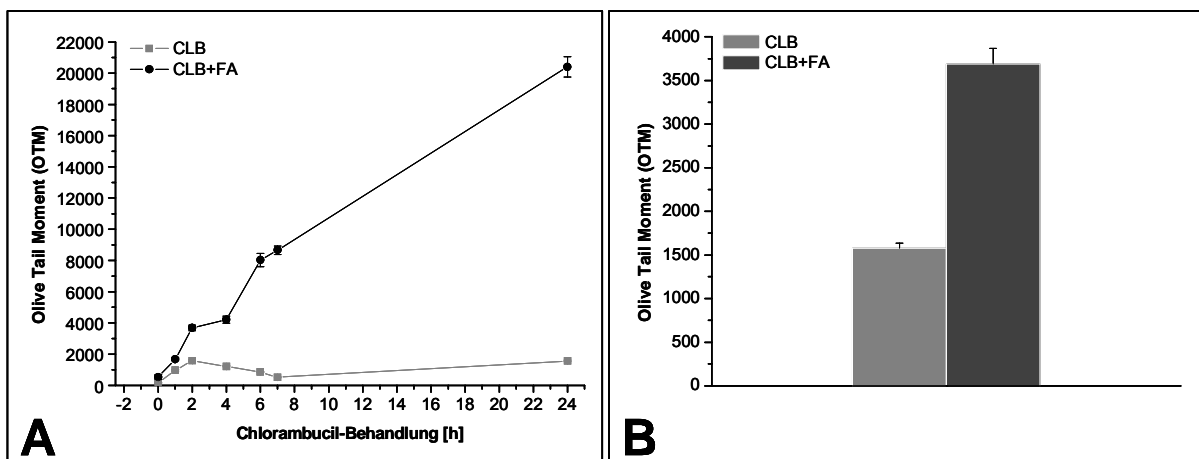


Abb. 23: Akkumulation von Chlorambucil induzierten DNA-Strangbrüchen durch Modulation des NER-Reparaturweges. A) DNA-Strangbruchkinetik von Normal-Lymphozyten unter Chlorambucil-Behandlung (50 μ M) bzw. unter kombinierter CLB- und Fludarabin-Behandlung (1 μ g/ml). **B)** Strangbruchraten von Normal-Lymphozyten nach 2 h unter CLB- bzw. unter kombinierter CLB- und Fludarabin-Behandlung.

Während das Maximum der Strangbrüche unter alleiniger Chlorambucil-Behandlung wie in Abb. 19 nach zwei Stunden erreicht wurde und ab diesem Zeitpunkt das Wiederverschließen der Reparaturlücken vorherrschte, wurde dieser Schritt unter

Fludarabin offenbar vollständig inhibiert (Abb. 23A). Die Blockierung der DNA-Polymerasen δ und ϵ , die für das Wiederauffüllen der während vorausgegangener NER-Schritte entstandenen Einzelstranglücken in der DNA verantwortlich sind, führte zu einer dauerhaften und bis zu 24 Stunden ansteigenden Akkumulation von nicht geschlossenen DNA-Strangbrüchen. Zum Zeitpunkt des OTM-Maximums nach zwei Stunden der CLB-Behandlung erhöhte die zusätzliche Fludarabin-Exposition die Anzahl der Strangbrüche um mehr als das Doppelte (Abb. 23B). Fludarabin alleine bewirkte unter diesen experimentellen Bedingungen keine Zunahme von Strangbrüchen gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

3.4.3 Relevanz der Chlorambucil induzierten DNA-Strangbrüche für die Induktion der Apoptose in normalen Lymphozyten

Im folgenden Abschnitt wurden die Induktion der Apoptose nach Chlorambucil-Behandlung normaler humaner Lymphozyten sowie die Auswirkung verschiedener DNA-Reparatur modifizierender Substanzen auf die Apoptoseinduktion nach CLB untersucht. Dazu wurde der „Annexin-V-Assay“ (Koopman *et al.*, 1994; van Engeland *et al.*, 1998) verwendet.

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, die u. a. durch eine Reihe morphologischer Veränderungen der Zelle charakterisiert ist. Dabei gehören Veränderungen der Zelloberfläche und der Plasmamembran zu den frühesten Ereignissen in apoptotischen Zellen. So wird das in intakten Zellen ins Zellinnere gerichtete Phospholipid Phosphatidylserin (PS) in die äußere Schicht der Plasmamembran verlagert, so dass auf der Außenseite der Membran exponiertes PS ein Kennzeichen früher Apoptose darstellt. Dieses exponierte PS wird mit hoher Affinität von dem Ca^{2+} abhängigen Phospholipid bindenden Protein Annexin V gebunden, das über eine FITC-Fluoreszenzmarkierung im Durchfluss-Zytometer quantifiziert werden kann (Koopman *et al.*, 1994; Ormerod, 2001). Da die Verlagerung von PS auch während nekrotischer Prozesse auftritt, dabei aber gleichzeitig die Plasmamembran geschädigt wird, wird Annexin V üblicherweise mit einem Lebendfarbstoff wie beispielsweise Propidium Iodid (PI) kombiniert. Auf diese Weise lassen sich apoptotische (Annexin V positiv, PI negativ) von toten Zellen (Annexin V positiv, PI positiv) unterscheiden.

Für den Nachweis apoptotischer Prozesse wurden normale Lymphozyten für 24 Stunden mit ansteigenden Chlorambucil-Konzentrationen behandelt und anschließend jeweils etwa 1×10^4 Zellen durchflusszytometrisch ausgewertet. Dabei wurde ab einer CLB-Konzentration von 20 μM ein leichter Anstieg von Annexin V positiven und PI negativen, apoptotischen Zellen festgestellt (Abb. 24A). Der Anteil an bereits toten, Annexin V und PI doppelt positiven Zellen war dabei jeweils mit dem der unbehandelten Kontrollen vergleichbar.

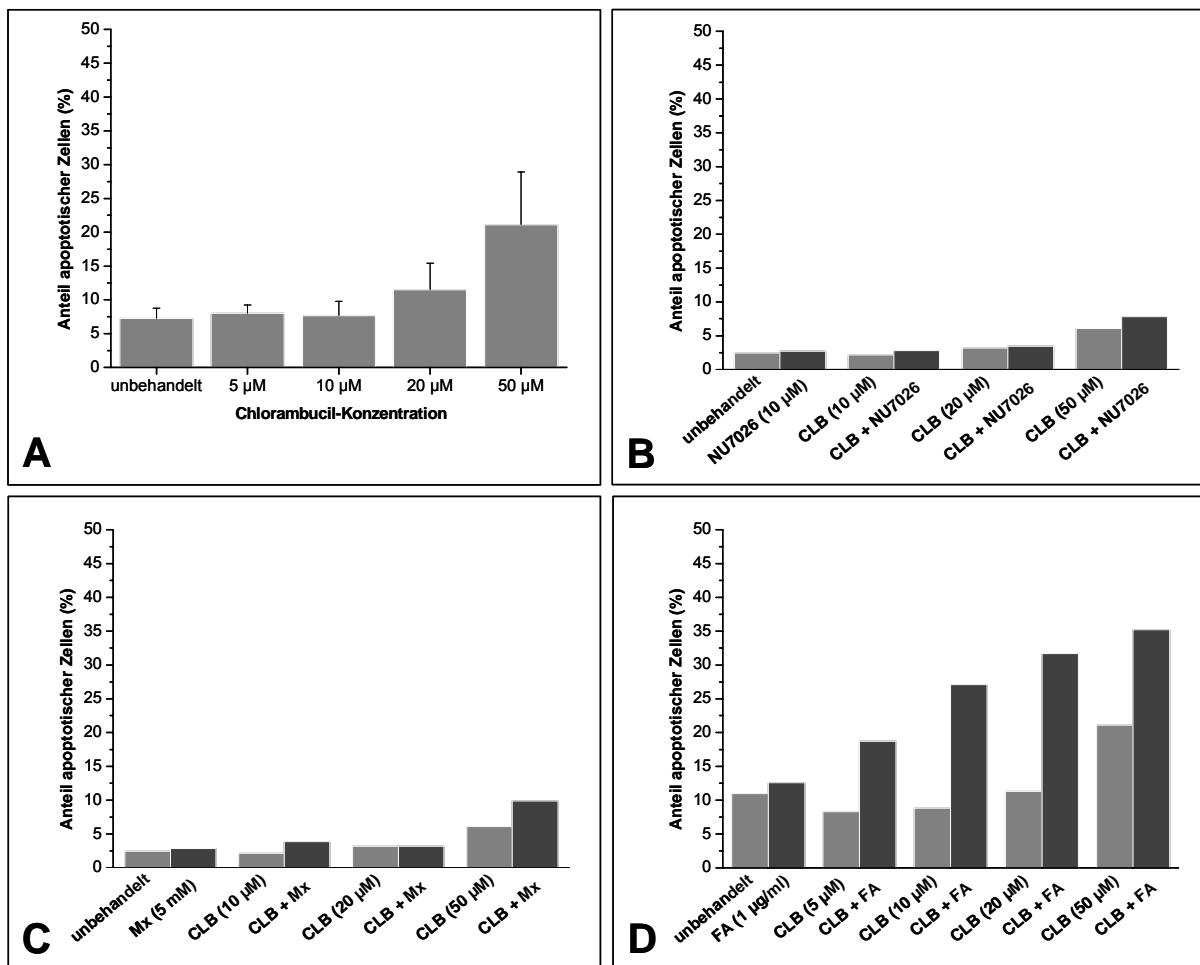


Abb. 24: Induktion und Modulation apoptotischer Prozesse nach Chlorambucil-Behandlung in normalen Lymphozyten. **A)** Ficoll gereinigte Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden für 24 h mit ansteigenden CLB-Konzentrationen behandelt und der Anteil der apoptotischen Zellen anschließend im Annexin V-Assay bestimmt ($n=4$; \pm -SEM). Ficoll gereinigte Lymphozyten eines gesunden Spenders wurden für 24 h mit ansteigenden CLB-Konzentrationen allein bzw. in Kombination mit **B)** dem NHEJ-Inhibitor NU7026 (10 μM), **C)** dem BER-Inhibitor Methoxyamin (5 mM) bzw. **D)** dem NER-Inhibitor Fludarabin (1 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und der Anteil der apoptotischen Zellen anschließend im Annexin-V-Assay bestimmt.

Durch den Einsatz von DNA-Reparaturmodulatoren konnte der Beitrag von nicht reparierten DNA-Läsionen und der Einfluss bestimmter DNA-Reparaturwege zur

Apoptose-Induktion nach Chlorambucil-Behandlung von normalen Lymphozyten gezeigt werden.

Bereits einzelne DNA-Doppelstrangbrüche reichen aus, um in einer Zelle den programmierten Zelltod einzuleiten. Diese Doppelstrangbrüche wiederum werden in ruhenden, nicht replizierenden Zellen vornehmlich durch das „Non-Homologous End-Joining“ DNA-Doppelstrangbruch-Reparatursystem um die DNA abhängige Proteinkinase beseitigt (Takata *et al.*, 1998; s. 1.2, Abb. 2). Im Gegensatz zu DNA-PK defizienten Zelllinien konnten DNA-PK profiziente Zellen in G₀ durch den Einsatz des DNA-PK Inhibitors NU7026 (10 µM) gegenüber strahlungsinduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen sensitiviert werden (Veuger *et al.*, 2003).

Um einen möglichen Beitrag von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Chlorambucil induzierten Apoptose zu überprüfen, wurden normale primäre Lymphozyten für 24 Stunden mit Chlorambucil allein oder in Kombination mit NU7026 inkubiert. Dabei wurde kein Einfluss von NU7026 auf die Chlorambucil induzierte Apoptose festgestellt. Im Gegenteil konnte auch bei Einsatz von 20 µM NU7026 nur die bekannte Abhängigkeit der Apoptoserate von der eingesetzten CLB-Konzentration beobachtet werden (Abb. 24B). Diese Beobachtungen stimmten mit den Ergebnissen aus den Assays zur Detektion von möglichen DNA-Doppelstrangbrüchen nach Chlorambucil-Behandlung überein (s. 3.4.2, Abb. 21).

Auch die Inhibierung der Basen-Exzisions-Reparatur und die damit verbundene mögliche Akkumulation von BER-Substraten nach Chlorambucil führte nicht zu einer erhöhten Apoptoserate nach kombinierter CLB- und Methoxyamingabe (Abb. 24C). Kombinierte man jedoch die Chlorambucil-Behandlung normaler Lymphozyten mit Fludarabin (1 µg/ml), so führte die Blockierung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur bereits bei einer 10fach geringeren CLB-Dosis (5 µM) zu einer Verdopplung der Apoptoserate (Abb. 24D). Dieser synergistische Effekt setzte sich mit zunehmender CLB-Konzentration fort. Daraus konnte geschlossen werden, dass die im Comet Assay beobachtete Akkumulation von sekundären, Reparatur induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen nach Chlorambucil und Fludarabin als Signal zur Einleitung der Apoptose dient. Dementsprechend scheinen die durch CLB induzierten DNA-Addukte hauptsächlich Substrat der NER zu sein.

4. Diskussion

Die Entwicklung von Resistenzen gegen unterschiedlich wirkende antineoplastische Chemotherapeutika stellt nach wie vor das größte klinische Problem bei der Behandlung von malignen Tumorerkrankungen dar. Die der Resistenz zugrunde liegenden zellulären, pharmakokinetischen oder auch systemischen Mechanismen sind mindestens ebenso vielfältig wie die Ansatzpunkte der jeweilig verwendeten Substanzklasse selbst. In dieser Arbeit wurde die Chronische Lymphatische Leukämie als Modell zur Untersuchung von möglichen Resistenzmechanismen verwendet. Auch im Lauf der zytoreduktiven Behandlung der CLL mit alkylierenden Substanzen wie Chlorambucil oder Cyclophosphamid treten bei allen Patienten früher oder später Resistenzen auf, die eine weitere effektive Behandlung dieser Erkrankung mit den bisher erfolgreich eingesetzten Medikamenten unmöglich machen.

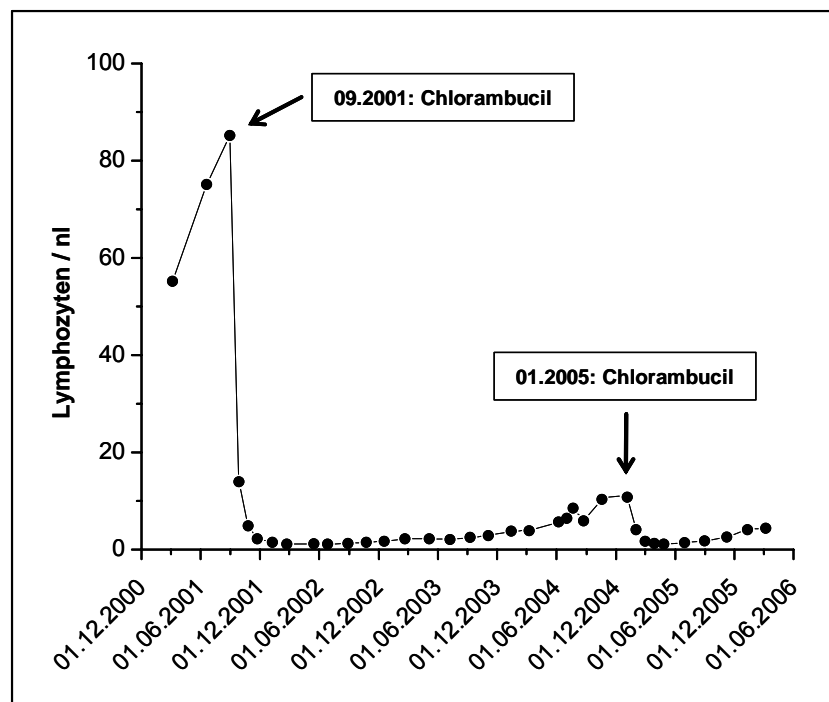


Abb. 25: „Traditioneller“ Behandlungsverlauf eines CLL-Patienten mit guter Prognose. Nach dem Anstieg der peripheren Lymphozytenzahlen auf über $8 \times 10^4/\mu\text{l}$ wurde der Patient im September 2001 behandlungspflichtig; nach mehreren Behandlungszyklen mit CLB und gutem Ansprechen auf die Therapie stabilisierte sich die periphere Lymphozytenzahl für etwa drei Jahre auf normalem Niveau ($2\text{-}5 \times 10^3$ Zellen/ μl), bevor im Januar 2005 u. a. ein beginnender Anstieg der Lymphozytenzahlen eine weitere Behandlungsrunde mit CLB erforderte, auf die wieder eine bis heute andauernde Remission folgte. Eine Resistenz gegen CLB konnte bisher bei diesem relativ „gutartigen“ Verlauf nicht beobachtet werden; bei einem Nicht-Ansprechen auf CLB in der Zukunft werden allerdings vermutlich alternative Chemotherapien notwendig werden.

Andererseits erfordert das Auftreten einer Resistenz gegen die bisherige Medikation die Verfügbarkeit von alternativen Behandlungsmöglichkeiten, deren Wirkungsweise sich logischerweise von der bisherigen Therapie, die zur Resistenzentwicklung geführt hat, unterscheiden sollte. Dieses klinische Prinzip ist bei der CLL, außerhalb von Studien, bisher standardmäßig in der Erstbehandlung der Erkrankung mit dem wirksamen und dabei sehr gut verträglichen Chlorambucil verwirklicht, das bei den meisten Patienten oft über viele Jahre sehr effektiv (Abb. 25) eingesetzt wird. Nach dem Versagen der CLB-Behandlung folgt in den meisten Fällen eine Sekundär-Therapie mit dem Nukleotid-Analogen Fludarabin, die ebenfalls zuverlässig zu teilweise lang anhaltenden Remissionen führt. Auch gegenüber Fludarabin entwickelt sich jedoch mit der Zeit eine Resistenz, die dann zu einer immer aggressiveren und schwer zu kontrollierenden CLL mit wenigen verbleibenden Therapieoptionen (wie z.B. neue auf Antikörpern basierende Behandlungsstrategien) führt.

4.1 Das differenzierte DNA-Reparaturverhalten von Therapie resistenten CLL-Lymphozyten ist nicht auf eine einfache Veränderung im Genexpressionsprofil von distinkten DNA-Reparaturwegen zurückzuführen

Als Ursache der Resistenz gegen antineoplastische Tumorthapien werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Ein möglicher Mechanismus für eine Resistenz gegenüber DNA reaktiven Substanzen ist die oft im Behandlungsverlauf erworbene Fähigkeit der malignen Zellen, die Therapie induzierten DNA-Modifikationen mit Hilfe von verschiedenen DNA-Reparatursystemen effektiver zu entfernen und so der Apoptose zu entgehen. Für die mononukleäre Zellfraktion von Therapie resistenten CLL-Patienten wurde bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe eine gute Korrelation zwischen der DNA-Reparaturkapazität und der Chemosensitivität dieser Zellen *in vitro* sowie dem klinischen Ansprechen der CLL auf die Behandlung mit alkylierenden Substanzen *in vivo* beschrieben (Müller *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1997; Buschfort *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche molekulare Determinanten für diese Korrelation identifiziert werden. Aufgrund der hohen Komplexität des „DNA damage response“-Netzwerks mit über 800 beteiligten Genen, das DNA-Reparatursysteme mit Apoptose-Signalkaskaden und Zellzyklus regulierenden Systemen verknüpft,

wurde in einem ersten Schritt das Transkriptom dieses Netzwerkes bei sensitiven und resistenten CLL-Lymphozyten mit Hilfe von Microarrays untersucht.

Die durch Ficoll-Aufreinigung aus dem peripheren Blut gewonnene mononukleäre Zellfraktion besteht bei gesunden Spendern zu 70-80 % aus T-Lymphozyten. Bei B-CLL-Patienten hingegen enthält diese Fraktion je nach klinischen Status entweder deutlich erhöhte Konzentrationen von malignen B-Lymphozyten (bis zu $1,5 \times 10^5/\mu\text{l}$ bei Erstdiagnose oder im fortgeschrittenen Stadium) oder normale Konzentrationen von $2-5 \times 10^3/\mu\text{l}$ nach erfolgreicher Behandlung. Derartige Schwankungen in der Zusammensetzung des peripheren Blutes können sowohl die Ergebnisse der empfindlichen Microarray-Analyse verzerren als auch zu Verschiebungen von funktionellen Messergebnissen auf Einzelzell-Ebene führen. Daher wurden in dieser Arbeit CD19⁺ Tumorzellen von unbehandelten bzw. Therapie sensitiven und Therapie resistenten CLL-Patienten aufgereinigt und von diesen RNA-Expressionsprofile sowie funktionelle DNA-Reparaturkinetiken erstellt. Auch Therapie resistente CD19⁺ CLL-Lymphozyten zeigten danach die für mononukleäre CLL-Zellen beschriebene beschleunigte DNA-Reparatur sowie eine hohe interindividuelle Varianz der Reparaturkapazität (Müller *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1997; Buschfort *et al.*, 1997) (s. 3.2.1, Abb. 4).

Grundsätzlich können derartige funktionelle Unterschiede auf der koordinierten differentiellen Expression von möglichen Schlüsselgenen in inzisionsaktiven Reparaturwegen wie der Basen-Exzisions-Reparatur oder der Nukleotid-Exzisions-Reparatur basieren. So bewirkt beispielsweise eine Überexpression von Glykosylasen (BER) oder Endonukleasen (NER) auf der einen Seite das beschleunigte Ausschneiden von DNA-Läsionen. Da dies allerdings zu einer Akkumulation von sekundären, wiederum zytotoxischen DNA-Strangbrüchen führt (Coquerelle *et al.*, 1995; Fishel *et al.*, 2003; Rinne *et al.*, 2004), müssten andererseits auch die nachfolgenden Polymerisierungs- und Ligationsschritte beschleunigt ablaufen, um die Einleitung der Apoptose zu vermeiden. Demnach wäre auch hier eine erhöhte Expression der entsprechenden Polymerase- bzw. Ligase-assoziierten Gene und somit eher eine differentielle Expression ganzer Reparaturwege zu erwarten. Zu dieser Modellvorstellung passt es, dass die initiale Inzisionsrate zu Beginn des Reparaturzeitraumes bei resistenten Zellen im Vergleich zu sensitiven Proben in den meisten Fällen höher lag (s. Abb. 4B). Da der zur DNA-Alkylierung verwendete Nitrosoharnstoff ENU weder metabolisiert noch der zelluläre ENU-Gehalt

durch Import- oder Exportmechanismen moduliert wird, waren diese vermehrten initialen Einschnitte vermutlich nicht auf eine erhöhte primäre Adduktbildung zurückzuführen. Eine schnelle Prozessierung dieser initialen Einschnitte konnte außerdem an der vergleichsweise schnelleren Abnahme der Reparatur induzierten Strangbrüche abgelesen werden (s. Abb. 4B). Diese Unterschiede im funktionellen Reparaturphänotyp von resistenten CD19⁺ CLL-Lymphozyten spiegelten sich jedoch nicht in einer differentiellen Expression von Genen distinkter Reparaturwege wider, deren Aktivität im Comet Assay gemessen werden konnte. Stattdessen wurden einzelne mit DNA-Reparatur assoziierte Gene differentiell exprimiert, deren Genprodukte selbst keinerlei Inzisionsaktivität besitzen und die nach heutigem Kenntnisstand nicht regulierend auf inzisionsaktive Reparaturschritte einwirken. So spielt beispielsweise *rad51*, das orthologe Gen zum bakteriellen *recA*, eine zentrale Rolle bei der Homologen Rekombination und bei der Homologen Rekombinationsreparatur von Doppelstrangbrüchen. Bis heute sind bei Säugetieren sieben *rad51* paraloge Gene bekannt, darunter auch *rad51l1* und *dmc1* mit jeweils etwa 20 % bzw. 50 % Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen (Bishop *et al.*, 1992; Thacker, 1999). Der Ausfall des *rad51*-Gens führt zum Zelltod, während die Paralogen für die zelluläre Überlebensfähigkeit nicht essentiell sind (Kawabata *et al.*, 2005). Ihr Ausfall resultiert aber in einer Häufung von spontanen chromosomalen Aberrationen (Takata *et al.*, 2000) sowie in einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin und Camptothecin (Yonetani *et al.*, 2005). *Rad51l1* und *dmc1* wurden in Chemotherapie resistenten CLL-Lymphozyten im Vergleich zu den sensitiven Zellen hingegen schwächer exprimiert (s. Abb. 11C). Da es sich bei den CLL-Zellen außerdem um nicht proliferierende Zellen in G₀/G₁ handelt, die für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen den RAD51 unabhängigen NHEJ-Reparaturweg benutzen (Takata *et al.*, 1998; s. Abb. 2), steht nach einer Validierung der Ergebnisse durch Untersuchung weiterer Proben eine von der HR-Reparatur unabhängige Funktion von RAD51L1/DMC1 zur Diskussion.

4.2 Die DNA-Reparaturkapazität individueller CLL-Proben spiegelt sich in der differentiellen Genexpression distinkter Reparaturwege wider

Die fehlende allgemeine Korrelation zwischen der funktionellen DNA-Reparatur und dem Expressionsmuster von DNA-Reparaturgenen in sensitiven versus resistenten CLL-Lymphozyten kann verschiedene Ursachen haben. So ist eine veränderte zelluläre DNA-Reparaturkapazität nur eine von mehreren Möglichkeiten einer Tumorzelle, eine klinische Resistenz zu entwickeln (s. 1.1). Dies ist eine mögliche Erklärung für die hohen interindividuellen Unterschiede in der globalen funktionellen Reparaturleistung (s. Abb. 4). Um den Einfluss von nicht Reparatur bedingten Störfaktoren für die Expressionsanalyse zu ermitteln, wurden die Expressionsprofile von „DNA damage response“-Genen bei CLL-Proben mit nachgewiesener schneller und langsamer Reparaturleistung unabhängig von der jeweiligen zellulären Sensitivität verglichen. Dabei wurde keine differentielle Expression von DNA-Reparaturgenen festgestellt. Dies könnte einerseits bedeuten, dass die unterschiedlichen DNA-Reparaturphänotypen nicht auf der Genexpressions-Ebene, sondern eher durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert werden.

Andererseits induziert der verwendete Ethylnitrosoharnstoff ENU ein breites DNA-Schadensspektrum, das Substrate für mehrere verschiedene DNA-Reparaturwege liefert. Daher ist alternativ eine bezüglich der Beteiligung einzelner Reparaturwege individuell sehr unterschiedliche Zusammensetzung der ENU provozierten globalen Reparaturantwort denkbar. In diesem Fall würde eine differentielle Expression von spezifischen DNA-Reparaturwegen, die zur Resistenz beitragen, bei Gruppenvergleichen mit hohen individuellen Schwankungen offensichtlich als nicht signifikant bewertet. Tatsächlich schwankt die Expression der untersuchten DNA-Reparaturgene innerhalb der sensitiven CLL-Proben ganz erheblich. Diese Schwankungen werden durch die Neugruppierung anhand des funktionellen DNA-Reparaturphänotyps etwas abgeschwächt, wobei die Expressionshöhe einzelner Gene innerhalb der Proben mit langsamer Reparaturcharakteristik immer noch über 70fach variieren kann. Derartig individuelle Schwankungen können bewirken, dass bei Gruppenvergleichen anhand des Mittelwertes ein Faktor 1,5 als Kriterium für differentiell exprimierte Gene unter Umständen nicht erreicht werden kann.

Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen konnte so bei der Auswertung individueller Proben ein positiver Zusammenhang zwischen der relativen Aktivität der

Nukleotid-Exzisions-Reparatur und der relativen Expressionshöhe mehrerer wichtiger NER-Gene festgestellt werden (s. 3.3.3, Abb.17).

RPA („Replication Protein A“) ist ein Protein, das an einzelsträngige DNA-Abschnitte bindet. Es besteht aus drei Untereinheiten von jeweils etwa 14, 32 bzw. 70 kD (RPA1, RPA2 bzw. RPA3). RPA spielt bei nahezu allen Vorgängen des zellulären DNA-Metabolismus wie z.B. bei der DNA-Replikation oder bei DNA-Reparaturprozessen eine wichtige Rolle (Christmann *et al.*, 2003; Sancar *et al.*, 2004). Dabei besitzt es ein weites Spektrum von Interaktionspartnern. Zusammen mit XPA ist es vermutlich für den Aufbau des Reparaturkomplexes im Rahmen der Nukleotid-Exzisions-Reparatur verantwortlich (He *et al.*, 1995; Burns *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2003; Thoma und Vasquez, 2003). Die Stabilisierung dieses Komplexes durch die RPA/XPA-Bindung ist ein möglicher Geschwindigkeits-bestimmender Schritt innerhalb der NER. Daher könnte eine konstitutiv hohe RNA-Expression der betreffenden Gene zu einem effektiveren Ablauf der NER in individuellen CLL-Proben führen. Da RPA außerdem auch an der Positionierung der Endonukleasen XPG und XPF-ERCC1 an der Schadensstelle beteiligt ist (Matsunaga *et al.*, 1996; de Laat *et al.*, 1998), könnte zusätzlich die Inzisionsreaktion an der beschädigten DNA beschleunigt ablaufen. Dies birgt allerdings die oben bereits beschriebene Gefahr der Akkumulation von potenziell zytotoxischen DNA-Strangbrüchen, falls diese nicht ausreichend schnell wieder verschlossen werden. An dieser Stelle könnte die erhöhte Expression von *rfc5* in resistenten CLL-Tumorzellproben (s. Abb. 11C) eine Rolle spielen. RFC5 ist eine Untereinheit des heteropentameren „Replication Factor C“ (RFC)-Proteinkomplexes, der für die Beladung der DNA mit dem PCNA-Protein verantwortlich ist (Majka und Burgers, 2004). DNA gebundenes PCNA wiederum organisiert verschiedene weitere Proteine während der Replikation und diverser DNA-Reparaturprozesse (NER, BER). Zusammen mit der individuellen differentiellen Expression von PCNA in CLL-Lymphozyten mit erhöhter NER-Aktivität (s. Abb. 17) ist eine effizientere Polymerisierungsreaktion durch die DNA-Polymerasen δ/ϵ denkbar (del Giglio *et al.*, 1993).

Auch in der retrospektiven Genexpressionsanalyse der mononukleären Zellen von Therapie resistenten CLL-Patienten wurden *rpa3* und *xpa* als erhöht exprimiert gefunden (s. 3.3.2.1, Abb. 9). Obwohl es sich bei dieser Analyse wiederum um einen Gruppenvergleich anhand von Expressionsmittelwerten handelte, unterstreicht doch gerade die angedeutet (d.h. nur knapp oberhalb der gewählten Signifikanzgrenze

liegende) erhöhte Expression dieser Gene in der resistenten Gruppe die Bedeutung der jeweiligen Gruppenzusammenstellung bei der Bewertung von interindividuellen Expressionsunterschieden.

Kombiniert man die in den individuellen Patientenanalysen beobachteten Befunde einer Korrelation von funktioneller Nutzung und der erhöhten RNA-Expression von zentralen Komponenten des NER-Weges mit den Ergebnissen der retrospektiven Genexpressionsanalyse, so weist die differentielle Expression von *ercc6* (*csb*), eines für die Transkriptions-gekoppelte Reparatur entscheidenden Gens (s. 1.2, Abb. 1), auf eine mögliche differentielle Nutzung dieses NER-Zweiges in einigen resistenten CLL-Tumorzellproben hin. Dies stellt gerade für nicht replizierende Zellen wie die untersuchten peripheren Lymphozyten eine effektive Möglichkeit dar, DNA-Schäden in aktiven und damit für das Zellüberleben essentiellen Abschnitten des Genoms zu reparieren. Damit verschaffen sich die resistenten Zellen einen selektiven Überlebensvorteil gegenüber sensitiven Zellen, in denen ein nicht oder nur sehr ineffektiv reparierter Transkriptionsblock durch DNA-Läsionen entweder zu einer kurzfristigen Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden oder mittelfristig zu einer Depletion von wichtigen Haushaltsproteinen führen würde. Da die untersuchten peripheren CLL-Lymphozyten in der Regel nicht replizieren und somit ihre genetische Information nicht mehr weitergeben, wäre eine differentielle Regulation von DNA-Reparatursystemen, die für die Integrität des gesamten, auch untranskribierten Genoms verantwortlich ist, für die Entwicklung einer Chemotherapie-Resistenz vermutlich zweitrangig.

4.3 Differentiell exprimierte „DNA damage response“-Gene interagieren in distinkten Signaltransduktionswegen

Die RNA-Expressionsanalyse der in dieser Arbeit untersuchten CD19⁺ CLL-Proben ergab insgesamt über 1000 differentiell exprimierte Gene von zum größten Teil noch unbekannter Bedeutung für die Resistenzentwicklung bei der CLL. In einem ersten Versuch zur systematischen Gruppierung und Einordnung dieser großen Zahl identifizierter Gene konnte in einer „Gene Ontology“-Analyse keine signifikante Anreicherung der als differentiell exprimiert gefundenen Gene in definierten biologischen Prozessen nachgewiesen werden (s. 3.3.2.2). In einem weiteren Ansatz

wurden jedoch mit Hilfe der „*Pathway Architect*“-Software alternativ 30 von 60 differentiell exprimierten „DNA damage response“-Genen (bzw. deren Genprodukte) in einem so genannten „Relevance Interaction Network“ (RIN) auf verschiedenen Ebenen miteinander verknüpft.

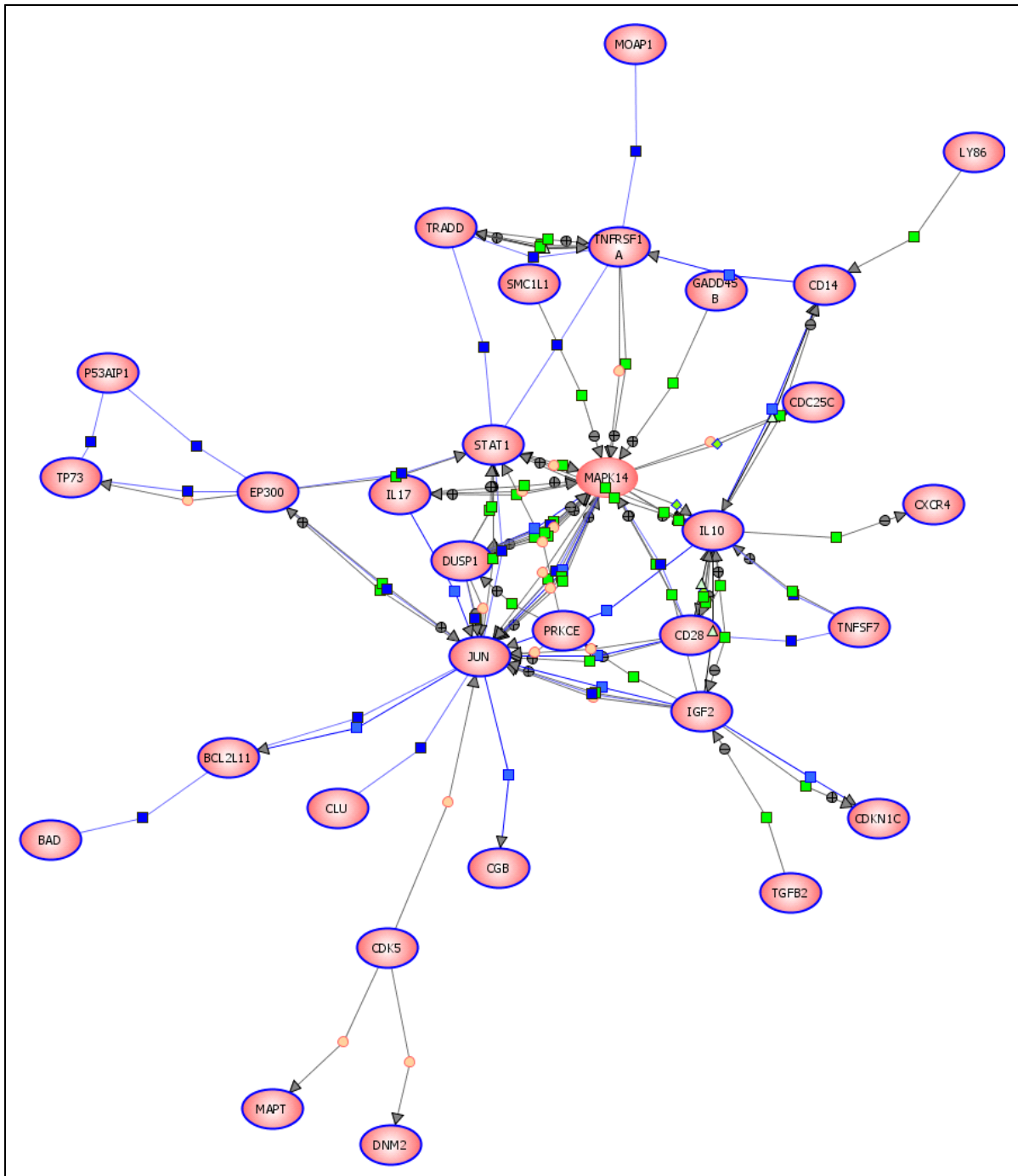


Abb. 26: „Relevance Interaction Network“. Dreißig zwischen sensiblen und resistenten CD19⁺ Tumorzellproben differentiell exprimierte „DNA damage response“-Gene (bzw. deren Genprodukte; blau umrandet) wurden unter Hinzufügen der MAPK14 (p38; nicht umrandet) auf verschiedenen Interaktionsebenen miteinander verknüpft (■ Regulation, positiv ⊕ / negativ ⊖; ■ Expression; ■ Bindung; ● Protein-Modifikation; ▲ Transport; ◆ Metabolismus)

In einem RIN wird die Relevanz der Interaktionen der eingelesenen Faktoren durch Hinzufügen von Faktoren, die nicht in der Liste der ursprünglichen Quelldaten (hier: der differentiell exprimierten Gene) vorhanden waren, erhöht. Im vorliegenden Fall werden so durch das alleinige Hinzufügen der Mitogen aktivierten Protein-Kinase p38 (MAPK14) viele der differentiell exprimierten Gene (Genprodukte) durch Interaktionen wie transkriptionelle Regulation, Bindung auf Proteinebene oder Protein-Modifikationen miteinander verbunden (Abb. 26).

MAP-Kinasen bilden den Integrationspunkt für verschiedenste biochemische Signale. Sie sind an einer ganzen Reihe von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Transkriptionsregulation oder Apoptose beteiligt (Chen *et al.*, 2001). p38 wird über mehrstufige Kinasekaskaden induziert, ausgelöst durch Zytokine oder Stressfaktoren aus der Umwelt. Alternativ führt eine DNA-Schädigung z.B. durch Alkylanzien oder UV-Licht zu erhöhten Transkriptmengen von Mitgliedern der GADD45-Familie (**G**rowth **A**rrest and **D**NA-**D**amage inducible), die wiederum die Aktivierung der p38-Signalkaskade sowie die Einleitung der Apoptose vermitteln (Takekawa und Saito, 1998; Hollander *et al.*, 1999). Die GADD45-Gruppe besteht aus den drei Genen *gadd45a*, *gadd45b* und *gadd45g* mit etwa 57 % Sequenzhomologie. *Gadd45b* wurde in resistenten CLL-Lymphozyten konsistent geringer exprimiert als in entsprechenden sensitiven Zellen (s. Abb. 11A). Dies könnte zu einer verminderten Aktivierung des p38-Weges und damit zu einer Apoptoseresistenz dieser Zellen beitragen. Auf der anderen Seite wird die Funktion von GADD45 (A, B, G) kontrovers diskutiert. So ist *gadd45a* das einzige Gen der Gruppe, das von p53 aktiviert werden kann (Hollander *et al.*, 1993; Zhan, 2005). Mäuse, denen GADD45A als Signalgeber fehlt, sind deutlich anfälliger für Strahlungs- und Zytostatika induzierte Tumoren, während die Überexpression von *gadd45a* zu einer gesteigerten DNA-Reparatur führt (Hildesheim und Fornace, Jr., 2002). Des Weiteren wurde bei Leberzell-Karzinomen eine spezifische, konstitutiv geringere *gadd45b*-Genexpression im Vergleich zum Normalgewebe und zu anderen Tumorentitäten wie Darm-, Brust- und Prostata-Krebs sowie Lymphomen gefunden (Qiu *et al.*, 2003). In normalen B-Lymphozyten führte eine CD40 induzierte Expression von GADD45B zu einer Unterdrückung der Fas vermittelten Apoptose (Zazzeroni *et al.*, 2003).

Auf der anderen Seite ist STAT1 (**S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription 1) ein integraler Bestandteil des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges: Über aktivierte

Zytokin- oder Hormonrezeptoren werden Janus-Kinasen (JAKs) induziert, die wiederum eine Gruppe von genregulatorischen Proteinen wie die STATs phosphorylieren. Diese so aktivierten Transkriptionsfaktoren stimulieren die Transkription ihrer Zielgene. Die *stat1*-Expression ist in Therapie resistenten CLL-Lymphozyten im Vergleich zu den sensitiven Zellproben sowohl in den mononukleären Zellproben (s. 3.3.2.1) als auch in den angereicherten CD19⁺ B-Lymphozyten (s. Abb. 11B) konsistent erhöht. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Strahlungs-resistenten CLL-Zellen, in denen eine vergleichsweise geringere *stat1*-Genexpression gefunden wurde (Vallat *et al.*, 2003). Konstitutive STAT1-Proteinaktivierung scheint hingegen bei vielen malignen Erkrankungen, vor allem bei akuten und chronischen Leukämien, gegeben zu sein (Lin *et al.*, 2000). So werden beispielsweise in B-CLL-Zellen Apoptoseprozesse infolge einer Blockierung der STAT1-Aktivierung durch Janus-Kinaseinhibitoren induziert (Martinez-Lostao *et al.*, 2005). In Docetaxel resistenten Prostatatumor-Zellen konnte in Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit eine erhöhte *stat1*-Genexpression nachgewiesen werden, die in einer entsprechenden Überexpression von (aktiviertem) Protein resultierte, während eine Inhibierung der STAT1-Expression mittels siRNA zu einer Re-Sensitivierung der resistenten Zellen führte (Patterson *et al.*, 2006).

Diese Beispiele verdeutlichen, dass der in dieser Arbeit erstellte Expressions-Datensatz noch eine Vielzahl von Möglichkeiten, auch unabhängig von DNA-Reparaturaspekten, für weiteres „data mining“ sowie nachfolgende Validierung und Untersuchung der differentiell exprimierten Gene bezüglich ihrer Relevanz für die Resistenzentwicklung bei der CLL eröffnet.

4.4 Phase I und II metabolisierende Enzyme werden in Therapie resistenten CLL-Lymphozyten weniger stark exprimiert

In der differentiellen Genexpressionsanalyse der CD19⁺ Tumorzell-Proben von unbehandelten bzw. Therapie sensitiven und Therapie resistenten CLL-Patienten befanden sich unter den 1040 differentiell exprimierten Genen auch solche, die für Phase I und II metabolisierende Enzyme (s. 1.1) sowie für Transportproteine codieren (Abb. 27), die als alternative Mediatoren zur Entstehung von Chemotherapie-Resistenzen beitragen können.

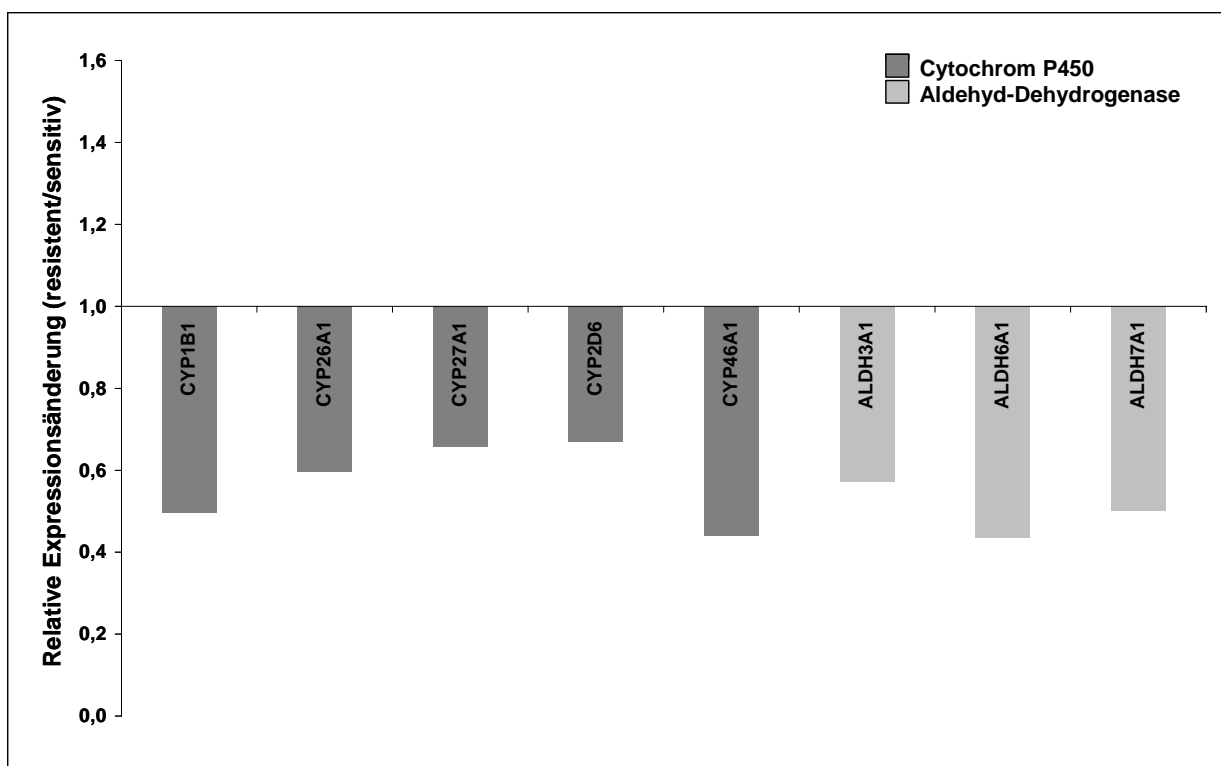


Abb. 27: Differenziell exprimierte Gene von Phase I / II metabolisierenden Enzymen bei 24 CD19⁺ CLL-Tumorzellproben. Die cDNA von dreizehn sensitiven bzw. elf resistenten CD19⁺ CLL-Tumorzellproben wurde auf Affymetrix HG-U133A-Microarrays hybridisiert, die Signalintensitäten mit der *RMAexpress*-Software erfasst und mit dem SAM-Test statistisch ausgewertet. Kriterium für differentiell exprimierte Gene: FDR $q < 25\%$, Relative Expressionsänderung $\leq 0,67$ bzw. $\geq 1,5$.

Die Untergruppen CYP1, CYP2 und CYP3 beinhalten die wichtigsten Mitglieder der Cytochrom-P450-Familie (Michael und Doherty, 2005). In Untersuchungen an humanen lymphoiden und myeloid-leukämischen Zelllinien wurde eine hohe Expression von *cyp1b1* sowie anderen Mitgliedern dieser Unterfamilien festgestellt (Nagai *et al.*, 2002). Außerdem konnte die Expression von CYP1B1 im Gegensatz zu

Normalgewebe in einer ganzen Reihe von primären humanen Tumoren immunhistochemisch nachgewiesen werden (Murray *et al.*, 1997). CYP1B1 könnte in diesen Fällen für eine tumorspezifische Aktivierung von antineoplastischen Substanzen verantwortlich sein: In einer weiteren Studie zur Interaktion von CYP1B1 mit 12 zytotoxischen Substanzen wurde beispielsweise die Aktivierung von Flutamid zu 4-Hydroxyflutamid gezeigt (Rochat *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang könnte die beobachtete geringere *cyp1b1*-Genexpression in Therapie resistenten primären CLL-Lymphozyten im Lauf mehrerer Behandlungszyklen einen Tumorzell-spezifischen CYP-Aktivitätsverlust zur Folge haben und dadurch zur Entwicklung einer Resistenz beitragen. Andererseits wurde in Tamoxifen resistenten Brusttumor-Zelllinien eine erhöhte mRNA-Expression von *cyp1b1* beobachtet, die allerdings nicht zu einer erhöhten Proteinaktivität führte (Brockdorff *et al.*, 2000). Daher sollte ein möglicher Aktivitätsverlust durch transkriptionelle Regulation in resistenten CLL-Lymphozyten mit zukünftigen funktionellen Untersuchungen auf Proteinebene bestätigt werden.

CYP2D6 hingegen ist als Mitglied der CYP2-Unterfamilie für die Tumorzell-spezifische Aktivierung von Tamoxifen bei der Behandlung von Brusttumoren verantwortlich (Crewe *et al.*, 2002; Patterson und Murray, 2002). Ein weiteres Substrat für CYP2D6 ist das in der Therapie der Chronischen Myeloiden Leukämie (CML) eingesetzte Imatinib (Lyseng-Williamson und Jarvis, 2001). Da auch bei der Behandlung dieser Tumor-Entitäten häufig Resistenzen auftreten, könnte dementsprechend die verminderte *cyp2d6*-Expression in resistenten CLL-Lymphozyten zur Resistenzentwicklung im Verlauf dieser Erkrankung beitragen.

Aldehyd-Dehydrogenasen wie ALDH1A1 und ALDH3A1 werden in primären und metastasierenden Brusttumoren exprimiert, wo sie zur Detoxifikation bzw. zur Inaktivierung von Cyclophosphamid beitragen (Sladek *et al.*, 2002). Die Expression von ALDH1A1 ist dabei invers mit der Chemosensitivität des Tumors korreliert (Sladek, 1999), so dass die ALDH1A1-Expression als Prognosefaktor für das Ansprechen einer Therapie mit Cyclophosphamid genutzt wird. Die Bedeutung der in dieser Arbeit gefundenen geringeren Genexpression von *aldh3a1* bei Therapie resistenten CLL-Lymphozyten ist vor diesem Hintergrund nicht eindeutig zu bewerten.

4.5 NER induzierte DNA-Einzelstrangbrüche verstärken die Apoptose nach *in vitro*-Behandlung von normalen Lymphozyten mit Chlorambucil

Die genaue Wirkungsweise von CLB ist trotz des langjährigen klinischen Einsatzes bisher in weiten Teilen unverstanden. Chlorambucil wird einerseits in der Leber in den antineoplastisch aktiven Metaboliten Phenylelessigsäure-Lost umgewandelt, andererseits unterliegen sowohl Chlorambucil selbst als auch Phenylelessigsäure-Lost *in vivo* der spontanen Hydrolyse in inaktive Derivate.

Die antineoplastische Aktivität von Chlorambucil und seiner Metabolite wird meist auf die Chloro-Ethylierung von nukleophilen Zentren zellulärer Makromoleküle wie Proteine, RNA und DNA zurückgeführt. Dabei wird CLB aufgrund seiner bifunktionellen Eigenschaften häufig als „Crosslinker“ bezeichnet. Als mögliche zytotoxische Eigenschaften von CLB kommen u. a. die Bildung von Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Vernetzungen („Crosslinks“) in Frage. Die antineoplastische Wirkung von klassischen, gut untersuchten Crosslinkern wie Mitomycin C, Cisplatin oder Melphalan beruht jedoch vorrangig auf der Bildung einer Reihe von DNA-Intra- bzw. Interstrang-Verknüpfungen vorrangig an N7 des Guanins. Vermutlich spielen CLB induzierte DNA-Schäden nicht zuletzt wegen der großen strukturellen Ähnlichkeit von Chlorambucil mit anderen Zytostatika aus der Stickstoff-Lost-Familie (z.B. Melphalan, Abb. 28) die wichtigste Rolle für die therapeutische Wirksamkeit des Medikaments.

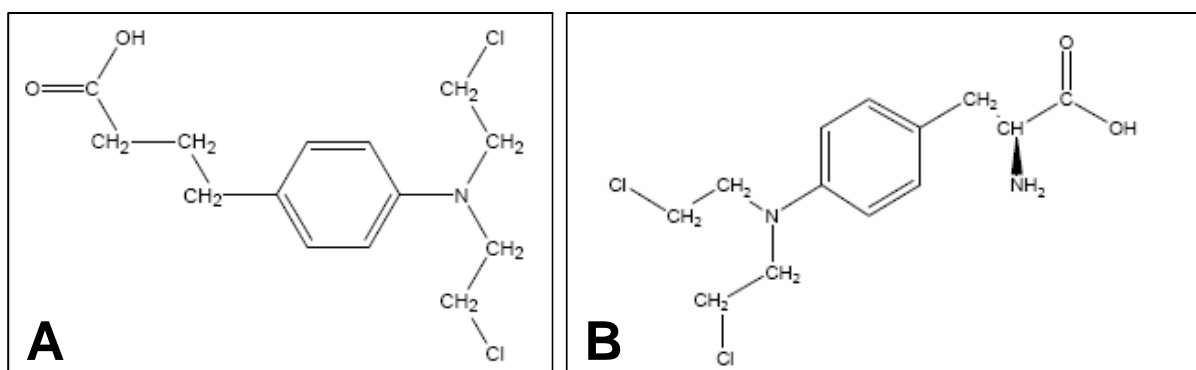


Abb. 28: Struktur alkylierender Moleküle vom Stickstoff-Lost Typ. A) Chlorambucil. B) Melphalan. Erkennbar sind jeweils die beiden Stickstoff gebundenen reaktiven Chloroethylgruppen.

In resistenten CLL-Lymphozyten wurde eine schnellere Abnahme von Melphalan induzierten DNA-Interstrang-Vernetzungen beobachtet, während Zellproben von

unbehandelten Patienten nach 24 Stunden noch keine Reparatur dieser DNA-Läsionen zeigten (Panasci *et al.*, 1988; Torres-Garcia *et al.*, 1989). Bis heute ist jedoch weder genau bekannt, welches DNA-Adduktspektrum eine Behandlung mit CLB hervorruft, noch welche DNA-Reparaturwege tatsächlich an der Entfernung dieser Addukte beteiligt sind.

In dieser Arbeit konnte indirekt gezeigt werden, dass Chlorambucil in primären humanen Lymphozyten mit der zellulären DNA interagiert. Schon kurz nach einer Exposition wurden DNA-Einzelstrangbrüche induziert, die auf die Inzisions-Aktivität der Nukleotid-Exzisions-Reparatur zurückgeführt werden konnten (s. 3.4.2). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Akkumulation derartiger sekundärer DNA-Läsionen zu einer erhöhten Apoptoserate führt (s. 3.4.3).

Das Auftreten von DNA-Einzelstrangbrüchen nach Chlorambucil-Behandlung ist auf verschiedenen Ebenen erklärbar (Abb. 29).

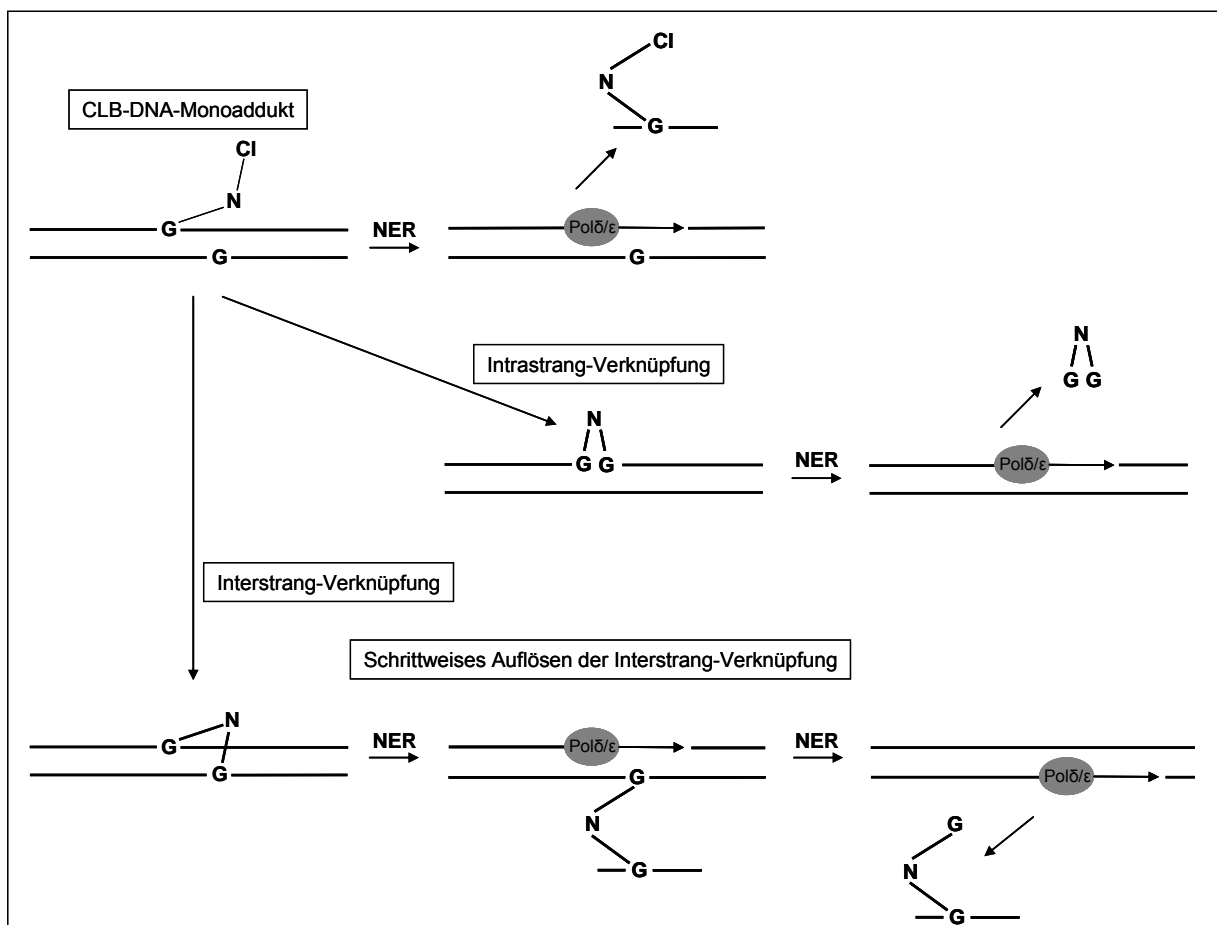


Abb. 29: Mögliche Entstehung von NER induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen nach Chlorambucil-Exposition. Auf jeder der dargestellten Ebenen wird eine Chlorambucil induzierte DNA-Modifikation durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt und die entstandene Reparaturlücke durch die Polymerasen δ oder ε aufgefüllt. Jeder dieser Polymerisierungsschritte ist durch NER-Inhibitoren blockierbar und führt prinzipiell zu einer Akkumulation von Einzelstrangbrüchen und zur Einleitung der Apoptose.

Einerseits ist eine schnelle Reaktion einer der beiden funktionellen Chloroethylgruppen des CLB beispielsweise an N7 eines Guanins denkbar. Dieses primäre Guanin-Monoaddukt könnte bereits als Substrat von Exzisions-Reparaturprozessen erkannt werden. Andererseits könnte die zweite funktionelle Gruppe mit einem weiteren Guanin auf dem gleichen oder dem gegenüber liegenden DNA-Strang weiter reagieren. Intrastrang-Verknüpfungen könnten anschließend analog zu UV induzierten DNA-Photoprodukten direkt durch NER-Exzision entfernt werden. Die Beseitigung von Interstrang-Verknüpfungen hingegen erfordert nach den bisherigen Vorstellungen eine koordinierte sequentielle NER-Aktivität, da die gleichzeitige Exzision gegenüber liegender, verknüpfter Guanin-Reste in der Bildung von hoch toxischen DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren würde.

Bisher konnten DNA-Interstrang-Verknüpfungen nach Chlorambucil-Behandlung von primären humanen Lymphozyten nur indirekt gezeigt werden (Hartley *et al.*, 1999); die mögliche Bedeutung dieser Läsionen für die Zytotoxizität hingegen wurde nur in Experimenten mit Zelllinien analysiert (Sunters *et al.*, 1992). Für andere bifunktionelle Zytostatika wie z.B. Cisplatin sind die Reaktionskinetik und die gebildeten spezifischen DNA-Addukte sehr viel besser untersucht (Siddik, 2003). Hier folgt der schnellen Initialreaktion an einer Guanin-N7-Position eine deutlich langsamere Reaktion der zweiten funktionellen Gruppe mit einer benachbarten Base im gleichen oder gegenüber liegenden DNA-Strang. Dabei machen die DNA-Interstrang-Verknüpfungen nur etwa 2 % aller Cisplatin-Addukte aus. Diese Befunde und die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass bereits die Monoaddukte von potenziellen Crosslinkern wie Cisplatin oder Chlorambucil vom Reparatursystem erkannt und effizient aus der DNA entfernt werden können. Wenn die dabei intermediär entstehenden Einzelstrangbrüche z.B. durch den Einsatz von Reparaturmodulatoren wie Fludarabin akkumulieren, können sie ein erhebliches zytotoxisches Potenzial aufweisen (Yamauchi *et al.*, 2001; Takagi *et al.*, 2004; s. 3.4.3). Die in dieser Arbeit gefundenen experimentellen Befunde schließen jedoch eine mögliche Beteiligung von Interstrang-Crosslinks an der Chlorambucil vermittelten Toxizität nicht gänzlich aus.

Bei der Beseitigung von DNA-Interstrang-Verknüpfungen wird häufig die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen diskutiert. Dabei ist es wichtig, zwischen proliferierenden und ruhenden Zellen zu unterscheiden. Während der Replikation entstehen fortwährend Einzelstrangbrüche im neu synthetisierten „lagging strand“ an

den Okazaki-Fragmenten oder durch die Aktivität der Mismatch-Reparatur an Polymerase-Fehlern. An solchen Stellen kann es durch die gleichzeitige Exzision von DNA-Läsionen aus dem Parentalstrang zu Doppelstrangbrüchen kommen, unabhängig davon, ob es sich dabei um Monoaddukte oder um bereits ausgebildete Crosslinks handelt. In nicht proliferierenden Zellen sollten Doppelstrangbrüche an DNA-Interstrang-Verknüpfungen nur bei gleichzeitiger Inzision in beide Stränge entstehen.

In dieser Arbeit konnten bei ruhenden, primären Normal-Lymphozyten keine Hinweise auf die Entstehung von Doppelstrangbrüchen nach Chlorambucil-Behandlung gefunden werden. Die Abwesenheit der typischen γ H2AX-Foci und die fehlende Sensitivierung der Zellen nach Blockierung des NHEJ-Reparaturweges unterstreichen, dass es sich bei den im Comet Assay beobachteten DNA-Einschnitten höchstwahrscheinlich um Einzelstrangbrüche handelt. Dazu passend wiesen die RNA-Expressionsprofile aller NHEJ-Komponenten keine Unterschiede zwischen den Tumorzellen von CLB resistenten und sensitiven CLL-Patienten auf.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde der CLB resistente Phänotyp mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität der DNA abhängigen Proteinkinase in CLL-Lymphozyten korreliert (Muller *et al.*, 1998). Da die DNA-PK zentraler Bestandteil der NHEJ-Reparatur für Doppelstrangbrüche ist, impliziert dies ein Auftreten derartiger Strangbrüche entweder als direkte Folge der Chlorambucil-Einwirkung oder als Reparaturintermediat bei der Crosslink-Reparatur. Ein Auftreten sowie eine verkürzte Persistenz von DNA-Doppelstrangbrüchen aufgrund erhöhter DNA-PK-Aktivität konnten bisher allerdings nur in Chlorambucil resistenten Zelllinien und nicht in primären Lymphozyten gezeigt werden (Boldogh *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte die zelluläre Resistenz gegen ionisierende Strahlung in CLL-Lymphozyten durch Inhibition der DNA-PK-Aktivität mit dem spezifischen Inhibitor NU7026 aufgehoben werden (Deriano *et al.*, 2005). Ionisierende Strahlung hat jedoch in der Behandlung der CLL keinerlei klinische Relevanz. Außerdem gehen die Autoren dieser Studie nicht auf eine mögliche Kreuzresistenz zwischen Bestrahlung und Chlorambucil-Behandlung bei den untersuchten Patienten ein. Eine Korrelation zwischen der *in vitro*-Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und gegenüber Chlorambucil wird zwar diskutiert, hat sich aber bisher nicht durchgesetzt (Bentley *et al.*, 1995; Kivekas *et al.*, 2002).

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Nukleotid-Exzisions-Reparatur einen erheblichen Beitrag zum funktionellen Reparaturphänotyp von CLL-Lymphozyten liefert. Die DNA reaktive Substanz ENU eignete sich aufgrund des breiten Schadensspektrums einerseits sehr gut, um erste modellhafte Einblicke in die Gesamt-Reparaturkapazität von bestimmten Zelltypen zu erlangen. Der individuelle Beitrag einzelner DNA-Reparaturwege zu dieser zellulären Reparaturantwort konnte dabei durch den gezielten Einsatz spezifischer Inhibitoren genauer bestimmt werden. Andererseits jedoch hat ENU bei der Behandlung der CLL keine klinische Relevanz. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit kann in zukünftigen Studien gezielt der Einfluss der Reparaturkapazität von CLL-Lymphozyten nach *ex vivo*-Exposition gegen das klinisch eingesetzte Chlorambucil im Comet Assay untersucht werden. Dabei ist es besonders interessant zu erfahren, ob CLL-Zellen nach Chlorambucil-Exposition den gleichen Verlauf der DNA-Strangbruchinduktion und -prozessierung aufweisen wie die hier untersuchten Normal-Lymphozyten. Erste Untersuchungen an einer begrenzten Zahl von CLL-Proben deuteten auf eine in beiden Zelltypen ähnlich verlaufende zelluläre Reparaturreaktion hin (Abb. 30A). Die Blockierung der Nukleotid-Exzision durch Fludarabin führte auch bei den Tumorzellen zu einer Akkumulation von DNA-Einzelstrangbrüchen (Abb. 30A) und zu einer erhöhten Apoptoserate (Abb. 30B).

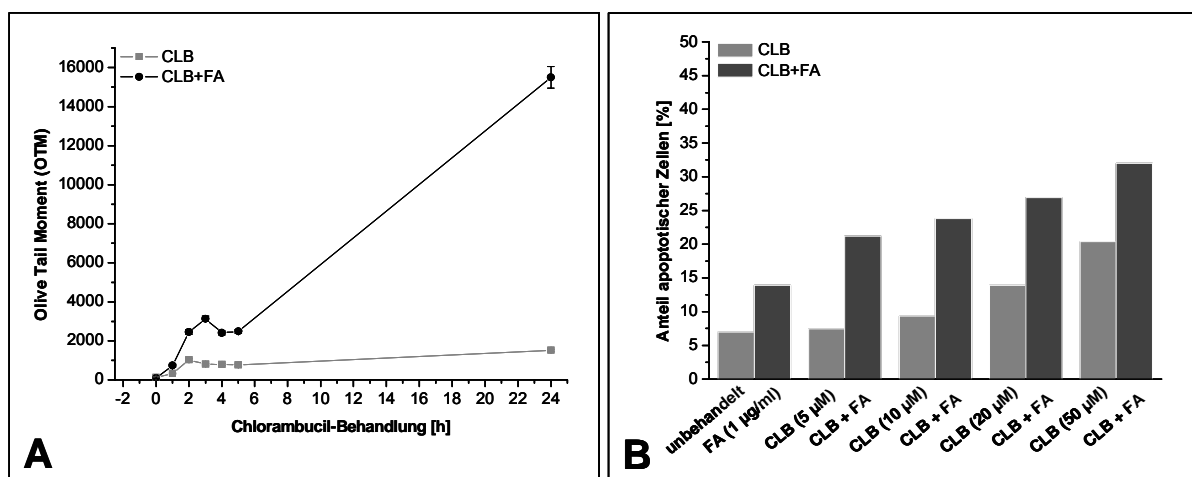


Abb. 30: Reaktion von CLL-Lymphozyten auf *in vitro*-Exposition gegen Chlorambucil. A) Ficoll gereinigte CLL-Lymphozyten wurden in RPMI1640-Medium mit 50 µM CLB behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und die Strangbruchraten im Comet Assay ermittelt. B) CLL-Lymphozyten wurden für 24 h mit ansteigenden CLB-Konzentrationen allein bzw. in Kombination mit Fludarabin (1 µg/ml) behandelt und der Anteil der apoptotischen Zellen anschließend im Annexin-V-Assay bestimmt.

Durch die serielle Analyse von klinisch gut charakterisierten CLL-Proben kann so der Zusammenhang zwischen DNA-Strangbruchprozessierung und der Apoptoseinduktion nach CLB-Behandlung *in vitro* unter spezieller Berücksichtigung des Einflusses der Nukleotid-Exzisions-Reparatur auf die klinische Resistenz von CD19⁺ CLL-Tumorzellen untersucht werden. Außerdem könnte bei einer derartigen Längsschnitt-Analyse die in dieser Arbeit gefundene Korrelation zwischen der RNA-Expression von NER-Schlüsselgenen und dem funktionellen NER-Beitrag zur Reparatur von CLB induzierten DNA-Schäden beispielsweise mit sensitiven RT-PCR-Verfahren analysiert werden. Auf diese Weise ließe sich die Relevanz einer differentiellen Genexpression für die Entwicklung einer Chemotherapie-Resistenz genauer belegen. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich eine individuell erhöhte RNA-Expression dieser Gene auch in einer entsprechend erhöhten Proteinmenge in den CLL-Zellen widerspiegelt.

Zur weiteren Charakterisierung der Chlorambucil induzierten DNA-Addukte bzw. der Reparaturwege, die an der Beseitigung dieser Läsionen beteiligt sind, bieten sich Reparatur defiziente Mausstämmen an. So könnte beispielsweise durch entsprechende Messungen an Lymphozyten von NER defizienten XPA- oder XPC-„knockout“-Mäusen die Bedeutung dieser Reparaturfunktion für die Prozessierung von Chlorambucil-Addukten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weiter untermauert werden.

Ein weiterer methodischer Ansatz zur Analyse von Genexpressionsdaten aus Microarray-Experimenten ist die Identifizierung von Gruppen ko-regulierter (Reparatur)-Gene in definierten Zellpopulationen. Dazu kann mit Hilfe so genannter „Clustering“-Algorithmen ein allgemeines Regulationsmuster interessanter Gene beispielsweise für normale B-Lymphozyten etabliert werden, das Aufschluss über die Wechselwirkungen bei der Expression dieser Gene gibt. In der Folge ließe sich dann die Integrität der entsprechenden Expressionsmuster sowohl von CLL-Lymphozyten im Allgemeinen als auch von Chemotherapie resistenten im Vergleich zu Therapie sensitiven Zellen analysieren. Mit solchen biomathematischen Verfahren könnten gegebenenfalls weitere interessante regulatorische Wechselwirkungen mit Genen ganz anderer, ebenfalls für die zelluläre Chemosensitivität bedeutsamer Funktionsbereiche, wie beispielsweise zirkadiane Steuerungsprozesse („clock genes“), Medikamenten-Transport oder -Metabolismus, aufgedeckt werden.

5. Zusammenfassung

Die Resistenzentwicklung stellt nach wie vor das größte klinische Problem bei der Behandlung von malignen Erkrankungen dar. Dies gilt prinzipiell für alle Medikament gestützten Therapieformen. Für den Bereich der klassischen, DNA reaktiven Zytostatika ist die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ein besonders geeignetes Modell zur Untersuchung von Resistenzmechanismen, da sich primäre Tumorzellen in großer Zahl und hohem Reinheitsgrad aus dem peripheren Blut von Patienten isolieren lassen. Außerdem ist die gesteigerte zelluläre Chemoresistenz bei Patienten, die refraktär gegenüber einer Therapie mit dem DNA schädigenden Standardmedikament Chlorambucil (CLB) geworden sind, häufig mit einer erhöhten DNA-Reparaturkapazität der Tumorzellen verknüpft.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche molekulare Determinanten für das Reparatur- und Resistenzverhalten von gereinigten CD19⁺ CLL-Zellen untersucht. Neben der funktionellen Messung von Reparaturvorgängen wurden mit der Microarray-Technik umfassende RNA-Expressionsprofile für Funktionen erstellt, die mit der Zellantwort auf DNA-Schädigung zusammenhängen.

Bei der vergleichenden Gruppenanalyse der Expressionsdaten CLB sensibler (n=13) und CLB refraktärer (n=11) Patienten konnte die erhöhte DNA-Reparaturkapazität der resistenten CLL-Zellen nicht auf eine einfache differentielle Genexpression in distinkten DNA-Reparaturwegen zurückgeführt werden. Individuelle Proben wiesen jedoch eine Korrelation zwischen funktioneller Aktivität der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und der Expression einzelner Geschwindigkeits-bestimmender Komponenten dieses Reparaturweges auf.

Da für das Standardmedikament Chlorambucil bisher weder Spektrum und Struktur der induzierten DNA-Schäden noch deren zytotoxisches Wirkprofil oder die an ihrer Elimination beteiligten Reparaturmechanismen im Einzelnen bekannt waren, wurden diese Zusammenhänge im zweiten Teil der Arbeit näher analysiert.

Mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese konnte erste Einblicke in die Induktion und die Prozessierung von DNA-Strangbrüchen in CLB exponierten primären humanen Lymphozyten gewonnen werden. Demnach werden die CLB-Addukte in der DNA hauptsächlich über den NER-Weg prozessiert. Eine Beteiligung von anderen Mechanismen wie Basen-Exzisions-Reparatur (BER) oder „Non-Homologous End-Joining“ (NHEJ) sowie die intermediäre Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen

konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Diese Befunde unterstreichen die aus den Expressionsdaten abgeleitete Bedeutung des NER-Weges als mögliche Determinante für die Entwicklung einer CLB-Resistenz bei CLL-Patienten. Weitere Unterstützung erlangt diese Schlussfolgerung durch die Beobachtung, dass das zweite wichtige CLL-Medikament Fludarabin seine zytotoxische Wirkung durch die Akkumulation von NER induzierten Reparaturintermediaten erzielt, die zu einer erhöhten Apoptoserate führen.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Relevanz der NER-Funktion könnte sich bei individuellen CLL-Patienten als der maßgebliche Resistenz vermittelnde Mechanismus herausstellen. Die *in vitro*-Bestimmung und nachfolgende *in vivo*-Modulation der NER-Aktivität beispielsweise durch angepasste klinische Chlorambucil/Fludarabin-Protokolle oder Einsatz neuer spezifischer NER-Inhibitoren bei CLB resistenten CLL-Patienten könnten neue Möglichkeiten zu einer individualisierten Behandlung bei aggressivem, multiresistentem Krankheitsverlauf eröffnen.

6. Literaturverzeichnis

- Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R. et al.** (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. **260**(5109):812-816
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X. et al.** (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. **403**(6769):503-511
- Andressoo, J. O. und Hoeijmakers, J. H.** (2005) Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutat Res*. **577**(1-2):179-194
- Bentley, P., Salter, R., Blackmore, J., Whittaker, J. A., Hanson, J. A. & Champion, A. R.** (1995) The sensitivity of chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to irradiation in vitro. *Leuk Res*. **19**(12):985-988
- Beranek, D. T.** (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*. **231**(1):11-30
- Bishop, D. K., Park, D., Xu, L. & Kleckner, N.** (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell*. **69**(3):439-456
- Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S. & Hanawalt, P. C.** (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*. **40**(2):359-369
- Boldogh, I., Roy, G., Lee, M. S., Bacsi, A., Hazra, T. K., Bhakat, K. K., Das, G. C. & Mitra, S.** (2003) Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNA-PKcs activity and low oxidative stress. *Toxicology*. **193**(1-2):137-152
- Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. & Speed, T. P.** (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. **19**(2):185-193
- Bracker, T. U., Giebel, B., Spanholtz, J., Sorg, U. R., Klein-Hitpass, L., Moritz, T. & Thomale, J.** (2006) Stringent regulation of DNA repair during human hematopoietic differentiation: a gene expression and functional analysis. *Stem Cells*. **24**(3):722-730
- Bramson, J., McQuillan, A., Aubin, R., Alaoui-Jamali, M., Batist, G., Christodouloupoulos, G. & Panasci, L. C.** (1995) Nitrogen mustard drug resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia as an in vivo model for crosslinking agent resistance. *Mutat Res*. **336**(3):269-278
- Brockdorff, B. L., Skouv, J., Reiter, B. E. & Lykkesfeldt, A. E.** (2000) Increased expression of cytochrome p450 1A1 and 1B1 genes in anti-estrogen-resistant human breast cancer cell lines. *Int J Cancer*. **88**(6):902-906

- Burns, J. L., Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L.** (1996) An affinity of human replication protein A for ultraviolet-damaged DNA. *J Biol Chem.* **271**(20):11607-11610
- Buschfort, C., Müller, M. R., Seeber, S., Rajewsky, M. F. & Thomale, J.** (1997) DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res.* **57**(4):651-658
- Caligaris-Cappio, F.** (2000) Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* **4**(1):5-21
- Chao, C. C.** (1996) Cross-resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) of a multidrug-resistant lymphoma cell line associated with decreased drug accumulation and enhanced DNA repair. *Eur J Pharmacol.* **305**(1-3):213-222
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. & Cobb, M. H.** (2001) MAP kinases. *Chem Rev.* **101**(8):2449-2476
- Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D. & Kaina, B.** (2001) Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer.* **92**(1):123-129
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. & Kaina, B.** (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* **193**(1-2):3-34
- Cleaver, J. E.** (2005) Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer.* **5**(7):564-573
- Colussi, C., Parlanti, E., Degan, P., Aquilina, G., Barnes, D., Macpherson, P., Karran, P., Crescenzi, M., Dogliotti, E. & Bignami, M.** (2002) The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol.* **12**(11):912-918
- Constantinou, A., Davies, A. A. & West, S. C.** (2001) Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell.* **104**(2):259-268
- Coquerelle, T., Dosch, J. & Kaina, B.** (1995) Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair. *Mutat Res.* **336**(1):9-17
- Costa, R. M., Chigancas, V., Galhardo, R. S., Carvalho, H. & Menck, C. F.** (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* **85**(11):1083-1099
- Crewe, H. K., Notley, L. M., Wunsch, R. M., Lennard, M. S. & Gillam, E. M.** (2002) Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos.* **30**(8):869-874

- Cromie, G. A., Connelly, J. C. & Leach, D. R.** (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*. **8**(6):1163-1174
- Day, R. S., III, Ziolkowski, C. H., Scudiero, D. A., Meyer, S. A., Lubiniecki, A. S., Girardi, A. J., Galloway, S. M. & Bynum, G. D.** (1980) Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature*. **288**(5792):724-727
- de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Sugasawa, K., Weterings, E., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H.** (1998) DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Dev*. **12**(16):2598-2609
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H.** (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*. **13**(7):768-785
- del Giglio, A., O'Brien, S., Ford, R. J., Jr., Manning, J., Saya, H., Keating, M., Johnston, D., Chamone, D. F. & Deisseroth, A. B.** (1993) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Lymphoma*. **10**(4-5):265-271
- Deriano, L., Guipaud, O., Merle-Beral, H., Binet, J. L., Ricoul, M., Potocki-Veronese, G., Favaudon, V., Maciorowski, Z., Muller, C., Salles, B. et al.** (2005) Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood*. **105**(12):4776-4783
- Dianov, G., Price, A. & Lindahl, T.** (1992) Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol Cell Biol*. **12**(4):1605-1612
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R. & Kaina, B.** (1998) Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol*. **73**(3):269-278
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbo, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G. & Krokan, H. E.** (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*. **3**(11):1389-1407
- Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. & Modrich, P.** (1996) Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(13):6443-6447
- Dürig, J., Nückel, H., Hüttmann, A., Kruse, E., Holter, T., Halfmeyer, K., Führer, A., Rudolph, R., Kalhori, N., Nusch, A. et al.** (2003) Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **101**(7):2748-2755

- Fishel, M. L., Seo, Y. R., Smith, M. L. & Kelley, M. R.** (2003) Imbalancing the DNA base excision repair pathway in the mitochondria; targeting and overexpressing N-methylpurine DNA glycosylase in mitochondria leads to enhanced cell killing. *Cancer Res.* **63**(3):608-615
- Friedberg, E. C.** (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer.* **1**(1):22-33
- Goth, R. und Rajewsky, M. F.** (1972) Ethylation of nucleic acids by ethylnitrosourea-1- 14 C in the fetal and adult rat. *Cancer Res.* **32**(7):1501-1505
- Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E.** (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* **2**(1):48-58
- Gottesman, M. M. und Pastan, I.** (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* **62**:385-427
- Haber, J. E.** (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* **16**(6):259-264
- Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. & Reed, J. C.** (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **82**(6):1820-1828
- Hanawalt, P. C.** (2001) Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat Res.* **485**(1):3-13
- Hanawalt, P. C.** (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene.* **21**(58):8949-8956
- Hartley, J. M., Spanswick, V. J., Gander, M., Giacomini, G., Whelan, J., Souhami, R. L. & Hartley, J. A.** (1999) Measurement of DNA cross-linking in patients on ifosfamide therapy using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Clin Cancer Res.* **5**(3):507-512
- He, Z., Henricksen, L. A., Wold, M. S. & Ingles, C. J.** (1995) RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature.* **374**(6522):566-569
- Hildesheim, J. und Fornace, A. J., Jr.** (2002) Gadd45a: an elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* **8**(8):2475-2479
- Hollander, M. C., Alamo, I., Jackman, J., Wang, M. G., McBride, O. W. & Fornace, A. J., Jr.** (1993) Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *J Biol Chem.* **268**(32):24385-24393
- Hollander, M. C., Sheikh, M. S., Bulavin, D. V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T. A., Kim, K. E., Tolosa, E., Ashwell, J. D. et al.** (1999) Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet.* **23**(2):176-184
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B. & Speed, T. P.** (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* **31**(4):e15

- Johnson, R. D. und Jasin, M.** (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* **19**(13):3398-3407
- Kawabata, M., Kawabata, T. & Nishibori, M.** (2005) Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama.* **59**(1):1-9
- Keating, M. J., O'Brien, S., Robertson, L. E., Kantarjian, H., Dimopoulos, M., McLaughlin, P., Cabanillas, F., Gregoire, V., Li, Y. Y., Gandhi, V. et al.** (1994) The expanding role of fludarabine in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma.* **14 Suppl 2**:11-16
- Kivekas, I., Vilpo, L. & Vilpo, J.** (2002) Relationships of in vitro sensitivities tested with nine drugs and two types of irradiation in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* **26**(11):1035-1041
- Klungland, A. und Lindahl, T.** (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* **16**(11):3341-3348
- Koomagi, R., Stammeler, G., Manegold, C., Mattern, J. & Volm, M.** (1996) Expression of resistance-related proteins in tumoral and peritumoral tissues of patients with lung cancer. *Cancer Lett.* **110**(1-2):129-136
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. & van Oers, M. H.** (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* **84**(5):1415-1420
- Kruh, G. D. und Belinsky, M. G.** (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* **22**(47):7537-7552
- Lavin, M. F., Birrell, G., Chen, P., Kozlov, S., Scott, S. & Gueven, N.** (2005) ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res.* **569**(1-2):123-132
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K.** (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst).* **3**(8-9):817-826
- Lin, T. S., Mahajan, S. & Frank, D. A.** (2000) STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene.* **19**(21):2496-2504
- Lindahl, T.** (1990) Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat Res.* **238**(3):305-311
- Lindahl, T., Karran, P. & Wood, R. D.** (1997) DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev.* **7**(2):158-169
- Lips, J. und Kaina, B.** (2001) DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis.* **22**(4):579-585
- Liuzzi, M. und Talpaert-Borle, M.** (1985) A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine. *J Biol Chem.* **260**(9):5252-5258

- Lynch, H. T., Smyrk, T. C., Watson, P., Lanspa, S. J., Lynch, J. F., Lynch, P. M., Cavalieri, R. J. & Boland, C. R.** (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. **104**(5):1535-1549
- Lyseng-Williamson, K. und Jarvis, B.** (2001) Imatinib. *Drugs*. **61**(12):1765-1774
- Madhusudan, S. und Middleton, M. R.** (2005) The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev*. **31**(8):603-617
- Majka, J. und Burgers, P. M.** (2004) The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. **78**:227-260
- Martinez-Lostao, L., Briones, J., Forne, I., Martinez-Gallo, M., Ferrer, B., Sierra, J., Rodriguez-Sanchez, J. L. & Juarez, C.** (2005) Role of the STAT1 pathway in apoptosis induced by fludarabine and JAK kinase inhibitors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. **46**(3):435-442
- Matsunaga, T., Park, C. H., Bessho, T., Mu, D. & Sancar, A.** (1996) Replication protein A confers structure-specific endonuclease activities to the XPF-ERCC1 and XPG subunits of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem*. **271**(19):11047-11050
- McNamee, J. P., McLean, J. R., Ferrarotto, C. L. & Bellier, P. V.** (2000) Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat Res*. **466**(1):63-69
- Mello, J. A., Acharya, S., Fishel, R. & Essigmann, J. M.** (1996) The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol*. **3**(7):579-589
- Mellon, I., Spivak, G. & Hanawalt, P. C.** (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*. **51**(2):241-249
- Michael, M. und Doherty, M. M.** (2005) Tumoral drug metabolism: overview and its implications for cancer therapy. *J Clin Oncol*. **23**(1):205-229
- Modrich, P. und Lahue, R.** (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. **65**:101-133
- Moorghen, M., Cairns, J., Forrester, L. M., Hayes, J. D., Hall, A., Cattani, A. R., Wolf, C. R. & Harris, A. L.** (1991) Enhanced expression of glutathione S-transferases in colorectal carcinoma compared to non-neoplastic mucosa. *Carcinogenesis*. **12**(1):13-17
- Mulder, T. P., Verspaget, H. W., Sier, C. F., Roelofs, H. M., Ganesh, S., Griffioen, G. & Peters, W. H.** (1995) Glutathione S-transferase pi in colorectal tumors is predictive for overall survival. *Cancer Res*. **55**(12):2696-2702
- Mullenders, L. H. und Berneburg, M.** (2001) Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J Photochem Photobiol B*. **65**(2-3):97-100

- Muller, C., Christodoulopoulos, G., Salles, B. & Panasci, L.** (1998) DNA-Dependent protein kinase activity correlates with clinical and in vitro sensitivity of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to nitrogen mustards. *Blood*. **92**(7):2213-2219
- Müller, M. R., Buschfort, C., Thomale, J., Lensing, C., Rajewsky, M. F. & Seeber, S.** (1997) DNA repair and cellular resistance to alkylating agents in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. **3**(11):2055-2061
- Müller, M. R., Seiler, F., Thomale, J., Buschfort, C., Rajewsky, M. F. & Seeber, S.** (1994) Capacity of individual chronic lymphatic leukemia lymphocytes and leukemic blast cells for repair of O6-ethylguanine in DNA: relation to chemosensitivity in vitro and treatment outcome. *Cancer Res*. **54**(16):4524-4531
- Murray, G. I., Taylor, M. C., McFadyen, M. C., McKay, J. A., Greenlee, W. F., Burke, M. D. & Melvin, W. T.** (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res*. **57**(14):3026-3031
- Nagai, F., Hiyoshi, Y., Sugimachi, K. & Tamura, H. O.** (2002) Cytochrome P450 (CYP) expression in human myeloblastic and lymphoid cell lines. *Biol Pharm Bull*. **25**(3):383-385
- Nance, M. A. und Berry, S. A.** (1992) Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet*. **42**(1):68-84
- Nebert, D. W. und Gonzalez, F. J.** (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem*. **56**:945-993
- Nooter, K., Sonneveld, P., Oostrum, R., Herweijer, H., Hagenbeek, T. & Valerio, D.** (1990) Overexpression of the *mdr1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by cyclosporin-A. *Int J Cancer*. **45**(2):263-268
- Okuyama, T., Maehara, Y., Endo, K., Baba, H., Adachi, Y., Kuwano, M. & Sugimachi, K.** (1994) Expression of glutathione S-transferase-pi and sensitivity of human gastric cancer cells to cisplatin. *Cancer*. **74**(4):1230-1236
- Olive, P. L. und Banath, J. P.** (1993) Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res*. **294**(3):275-283
- Olive, P. L., Banath, J. P. & Durand, R. E.** (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*. **122**(1):86-94
- Ormerod, M. G.** (2001) Using flow cytometry to follow the apoptotic cascade. *Redox Rep*. **6**(5):275-287
- Panasci, L., Henderson, D., Torres-Garcia, S. J., Skalski, V., Caplan, S. & Hutchinson, M.** (1988) Transport, metabolism, and DNA interaction of melphalan in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. **48**(7):1972-1976

- Patterson, L. H. und Murray, G. I.** (2002) Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr Pharm Des.* **8**(15):1335-1347
- Patterson, S. G., Wei, S., Chen, X., Sallman, D. A., Gilvary, D. L., Zhong, B., Pow-Sang, J., Yeatman, T. & Djeu, J. Y.** (2006) Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells. *Oncogene.*
- Pegg, A. E., Dolan, M. E. & Moschel, R. C.** (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **51**:167-223
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., Kuhfittig-Kulle, S. & Obe, G.** (2004) Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res.* **104**(1-4):7-13
- Qian, X., von Wronski, M. A. & Brent, T. P.** (1995) Localization of methylation sites in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter: correlation with gene suppression. *Carcinogenesis.* **16**(6):1385-1390
- Qiu, W., David, D., Zhou, B., Chu, P. G., Zhang, B., Wu, M., Xiao, J., Han, T., Zhu, Z., Wang, T. et al.** (2003) Down-regulation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45beta expression is associated with human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* **162**(6):1961-1974
- Rinne, M., Caldwell, D. & Kelley, M. R.** (2004) Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **3**(8):955-967
- Rochat, B., Morsman, J. M., Murray, G. I., Figg, W. D. & McLeod, H. L.** (2001) Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation? *J Pharmacol Exp Ther.* **296**(2):537-541
- Rosenwald, A. und Staudt, L. M.** (2003) Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* **44 Suppl 3**:S41-S47
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S.** (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* **73**:39-85
- Schärer, O. D. und Jiricny, J.** (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays.* **23**(3):270-281
- Schwarz, K., Ma, Y., Pannicke, U. & Lieber, M. R.** (2003) Human severe combined immune deficiency and DNA repair. *Bioessays.* **25**(11):1061-1070
- Sedgwick, B., Robins, P., Totty, N. & Lindahl, T.** (1988) Functional domains and methyl acceptor sites of the Escherichia coli ada protein. *J Biol Chem.* **263**(9):4430-4433
- Shiraishi, A., Sakumi, K. & Sekiguchi, M.** (2000) Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis.* **21**(10):1879-1883

- Siddik, Z. H.** (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. **22**(47):7265-7279
- Silber, R., Degar, B., Costin, D., Newcomb, E. W., Mani, M., Rosenberg, C. R., Morse, L., Drygas, J. C., Canellakis, Z. N. & Potmesil, M.** (1994) Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs. *Blood*. **84**(10):3440-3446
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L.** (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. **175**(1):184-191
- Sladek, N. E.** (1999) Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Curr Pharm Des*. **5**(8):607-625
- Sladek, N. E., Kollander, R., Sreerama, L. & Kiang, D. T.** (2002) Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother Pharmacol*. **49**(4):309-321
- Staudt, L. M.** (2003) Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N Engl J Med*. **348**(18):1777-1785
- Sunters, A., Springer, C. J., Bagshawe, K. D., Souhami, R. L. & Hartley, J. A.** (1992) The cytotoxicity, DNA crosslinking ability and DNA sequence selectivity of the aniline mustards melphalan, chlorambucil and 4-[bis(2-chloroethyl)amino] benzoic acid. *Biochem Pharmacol*. **44**(1):59-64
- Takagi, K., Kawai, Y., Yamauchi, T. & Ueda, T.** (2004) Inhibition of repair of carboplatin-induced DNA damage by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine in quiescent human lymphocytes. *Biochem Pharmacol*. **68**(9):1757-1766
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Fukushima, T., Morrison, C., Albala, J. S., Swagemakers, S. M., Kanaar, R., Thompson, L. H. & Takeda, S.** (2000) The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol*. **20**(17):6476-6482
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. & Takeda, S.** (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*. **17**(18):5497-5508
- Takekawa, M. und Saito, H.** (1998) A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*. **95**(4):521-530
- Taverna, P., Liu, L., Hwang, H. S., Hanson, A. J., Kinsella, T. J. & Gerson, S. L.** (2001) Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. *Mutat Res*. **485**(4):269-281

- Thacker, J.** (1999) A surfeit of RAD51-like genes? *Trends Genet.* **15**(5):166-168
- Thoma, B. S. und Vasquez, K. M.** (2003) Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair. *Mol Carcinog.* **38**(1):1-13
- Thomale, J., Seiler, F., Müller, M. R., Seeber, S. & Rajewsky, M. F.** (1994) Repair of O6-alkylguanines in the nuclear DNA of human lymphocytes and leukaemic cells: analysis at the single-cell level. *Br J Cancer.* **69**(4):698-705
- Torres-Garcia, S. J., Cousineau, L., Caplan, S. & Panasci, L.** (1989) Correlation of resistance to nitrogen mustards in chronic lymphocytic leukemia with enhanced removal of melphalan-induced DNA cross-links. *Biochem Pharmacol.* **38**(18):3122-3123
- Townsend, D. M. und Tew, K. D.** (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* **22**(47):7369-7375
- Tsuzuki, T., Sakumi, K., Shiraishi, A., Kawate, H., Igarashi, H., Iwakuma, T., Tominaga, Y., Zhang, S., Shimizu, S. & Ishikawa, T. e. A.** (1996) Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis.* **17**(6):1215-1220
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G.** (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(9):5116-5121
- Umar, A. und Kunkel, T. A.** (1996) DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem.* **238**(2):297-307
- Vallat, L., Magdelenat, H., Merle-Beral, H., Masdehors, P., Potocki, d. M., Davi, F., Kruhoffer, M., Sabatier, L., Orntoft, T. F. & Delic, J.** (2003) The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood.* **101**(11):4598-4606
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B. & Reutelingsperger, C. P.** (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* **31**(1):1-9
- van Hoffen, A., Natarajan, A. T., Mayne, L. V., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. & Venema, J.** (1993) Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res.* **21**(25):5890-5895
- Veuger, S. J., Curtin, N. J., Richardson, C. J., Smith, G. C. & Durkacz, B. W.** (2003) Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res.* **63**(18):6008-6015
- Wang, H., Lawrence, C. W., Li, G. M. & Hays, J. B.** (1999) Specific binding of human MSH2.MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases. *J Biol Chem.* **274**(24):16894-16900

- Wilhelm, M., Tony, H. P., Rueckle-Lanz, H. & Wilms, K.** (1997) First-line therapy of advanced chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. **11 Suppl 2**:S14-S18
- Wilson, S. H.** (1998) Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat Res*. **407**(3):203-215
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. & Lindahl, T.** (2001) Human DNA repair genes. *Science*. **291**(5507):1284-1289
- Wyman, C., Ristic, D. & Kanaar, R.** (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. **3**(8-9):827-833
- Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R. & Karran, P.** (1997) Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res*. **25**(3):491-496
- Yamauchi, T., Kawai, Y. & Ueda, T.** (2002) Inhibition of nucleotide excision repair by fludarabine in normal lymphocytes in vitro, measured by the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Jpn J Cancer Res*. **93**(5):567-573
- Yamauchi, T., Nowak, B. J., Keating, M. J. & Plunkett, W.** (2001) DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin Cancer Res*. **7**(11):3580-3589
- Yarosh, D. B., Foote, R. S., Mitra, S. & Day, R. S., III** (1983) Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer- human tumor cell strains. *Carcinogenesis*. **4**(2):199-205
- Yonetani, Y., Hochegger, H., Sonoda, E., Shinya, S., Yoshikawa, H., Takeda, S. & Yamazoe, M.** (2005) Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*. **33**(14):4544-4552
- Zazzeroni, F., Papa, S., Algeciras-Schimmich, A., Alvarez, K., Melis, T., Bubici, C., Majewski, N., Hay, N., De Smaele, E., Peter, M. E. et al.** (2003) Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis. *Blood*. **102**(9):3270-3279
- Zhan, Q.** (2005) Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res*. **569**(1-2):133-143
- Zhou, Z. Q., Manguino, D., Kewitt, K., Intano, G. W., McMahan, C. A., Herbert, D. C., Hanes, M., Reddick, R., Ikeno, Y. & Walter, C. A.** (2001) Spontaneous hepatocellular carcinoma is reduced in transgenic mice overexpressing human O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(22):12566-12571

7. Anhang

7.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

PD Dr. Jürgen Thomale, der mich bei dieser Dissertation betreut und mit dem interessanten Gebiet der DNA-Reparaturforschung bekannt gemacht hat, danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung und die vielen Diskussionen und Gespräche.

PD Dr. Jan Dürig (Klinik für Hämatologie am Zentrum für innere Medizin) und PD Dr. Thomas Moritz (Labor für experimentelle Hämatologie der inneren Klinik/Tumorforschung) danke ich für die Unterstützung bei der Auswahl und klinischen Charakterisierung der untersuchten CLL-Patienten sowie die gute Zusammenarbeit und ständige Diskussionsbereitschaft im Lauf dieser Arbeit.

Ich danke der AG DNA-Reparaturlabor für ihre freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima. Besonders danke ich Dr. Tomke Bracker für die freundschaftliche Zusammenarbeit mit vielen hilfreichen Diskussionen und Gesprächen nicht nur zu wissenschaftlichen Themen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank PD Dr. Ludger Klein-Hitpass und den Kolleginnen im BioChip-Labor (IFZ) für die Erstellung der Genexpressionsanalysen und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in allen Fragen der Microarray-Analytik.

Vielen Dank an Brigitte Fischer und Beate Voßen sowie die Mitarbeiterinnen der hämatologischen Ambulanz (Klinik für Hämatologie) für die Organisation und Durchführung der Blutentnahmen bei CLL-Patienten und Normalblutspendern.

Anja Führer (Molekularbiologisches Labor der Klinik für Hämatologie) danke ich für die Aufreinigung von CLL-Tumorzellproben.

Bei Dipl. Ing. Klaus Lennartz (IFZ) bedanke ich mich für die vielen nützlichen Tipps und die ständige Hilfsbereitschaft in allen Belangen der Computer- und Netzwerkadministration.

Ich danke Birgit Weber und Michael Derda für die Organisation der inneren Abläufe des IFZ sowie Hans Zieren für die technische Hilfe, wenn z.B. mal wieder „der Ofen aus“ war.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir das Studium ermöglicht haben, ohne das diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Frau Nicole für ihre fortwährende Unterstützung, für die vielen kleinen und großen Aufmunterungen und schließlich für ihre Geduld während der Arbeiten zu dieser Dissertation bedanken.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	René Deenen
Anschrift	Berliner Str. 171 47918 Tönisvorst
Geburtsdatum	24.08.1976
Geburtsort	Rheinberg
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1983-1987	Gemeinschafts-Grundschule Millingen
1987-1996	Amplonius-Gymnasium Rheinberg
	Abschluss: Abitur

Hochschulstudium

1997-2002	Diplomstudium Biologie Ruhr-Universität Bochum Diplomarbeit mit dem Titel: „Funktionelle Untersuchungen am Geruchsrezeptor Or83b aus <i>Drosophila melanogaster</i> “ Abschluss: Diplom
-----------	--

Berufstätigkeit

seit 02.12.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) Universitätsklinikum Essen Promotion zum Thema: „Expression und Funktion von DNA-Reparatur- Mechanismen: Determinanten für die Therapie- Resistenz bei primären humanen Leukämiezellen“
-----------------	---

Sonstige Ausbildungen

1996-1997	Grundwehrdienst, Hildesheim Sanitätsdienst der Bundeswehr, Wesel
2004-2005	Vorlesung „Grundlagen des tierexperimentellen Arbeitens“ Übung „Fachgerechter Umgang mit den kleinen Labortieren Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen“

Essen, 31.05.2006

7.3 Veröffentlichungen

Hüttmann, A., Klein-Hitpass, L., Thomale, J., Deenen, R., Carpinteiro, A., Nüchel, H., Führer, A., Edelmann, J., Sellmann, L., Dührsen, U., & Dürig, J. Gene signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Leukemia advance online publication*, August 17, 2006.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 31.05.2006

(Deenen)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist..

Essen, 31.05.2006

(Deenen)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema *"Expression und Funktion von DNA-Reparaturmechanismen: Determinanten für die Therapie-Resistenz bei primären humanen Leukämiezellen"* zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Deenen befürworte.

Essen, 31.05.2006

(Thomale)